

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Направление медицина

Кафедра инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии

Допускается к защите
Заведующий кафедрой
д.м.н., проф. Яковлев А.А.,

(подпись)

« » _____ 2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

Современные подходы к этиотропной терапии менингитов, вызванных
Cryptococcus neoformans

Выполнил студент
Шилов Андрей Максимович
604 группы

Научный руководитель:
к.м.н., доц. Соколова Ольга Игоревна

Санкт-Петербург
2020 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Этиология криптококкоза	-
1.1.1. Морфология возбудителя	-
1.1.2. Факторы патогенности	12
1.1.3. Антигенная структура	15
1.2. Эпидемиология	16
1.3. Патогенез	18
1.4. Клиническая картина.....	21
1.5. Лабораторная диагностика.....	26
1.6. Лечение	30
1.6.1 Используемые препараты.....	-
1.6.2. Практические аспекты лечения.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
3.1. Сравнительная характеристика выявленных случаев	-
3.2. Стадирование ВИЧ-инфекции и коморбидные заболевания	44
3.3. Иммунологическая характеристика	47
3.4. Особенности неврологического статуса	50
3.5. Ликворологическая характеристика	52
3.6. Сравнение эффективности AmBd и L-AMB	54
3.7. Сравнение токсичности AmBd и L-AMB	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	67
ВЫВОДЫ.....	69
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	71

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АРВТ – антиретровирусная терапия

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВСВИ – воспалительный синдром восстановления иммунитета

ВЧД – внутричерепное давление

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИФА – иммуноферментный анализ

КФК - креатинфосфокиназа

ЛЖВ – люди, живущие с ВИЧ

ОФК – орофарингеальный кандидоз

ПМЛ – прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия

ПТИ – протромбиновый индекс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

СКВ – системная красная волчанка

СМЖ – спинномозговая жидкость

СПИД – синдром приобретённого иммунодефицита

ХБП – хроническая болезнь почек

ЦНС – центральная нервная система

ЧДД – частота дыхательных движений

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭКГ – электрокардиограмма

5-FC – 5-fluorocytosine, 5-фторцитозин

ABLC – amphotericin B lipid complex, амфотерицина В липидный комплекс

AmBd - amphotericin B deoxycholate, амфотерицина В дезоксихолат

CD4 – Cluster of Differentiation 4, кластер дифференцировки 4 типа

С-РБ – С-реактивный белок

CDC – Centers for Disease Control and Prevention, Центры по Контролю и профилактике заболеваний США

CKD-EPI - Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CrAg – serum cryptococcal antigen, сывороточный криптококковый антиген

CYP450 – cytochrome P450, цитохром P450

GXL – glucuronoxylomannan, глюкуронилксиломаннан

GXLGal – glucuronoxylomannan, глюкуронилксиломаннангалактан

L-AMB – liposomal amphotericin B, липосомальный амфотерицин В

L-DOPA – L-3,4-dihydrophenylalanine, L-3,4-дигидроксифенилаланин

ВВЕДЕНИЕ

Криптококкоз представляет собой повсеместно распространенное инфекционное заболевание, вызываемое инкапсулированными дрожжевыми грибами рода *Cryptococcus* и имеющее широкий спектр клинических проявлений. Среди прочих форм наиболее опасной для жизни больного является криптококковый менингоэнцефалит. Данная патология выявляется почти исключительно у лиц с синдромом приобретенного иммунодефицита, явившимся следствием ВИЧ-инфекции, лимфопролиферативных заболеваний или приема иммуносупрессивной терапии. [1]

К настоящему моменту описаны 2 вида, способные провоцировать развитие болезни у человека: *Cryptococcus neoformans* и *Cryptococcus gattii*. Эти организмы являются факультативными внутриклеточными паразитами: в окружающей среде они могут обнаруживаться свободно растущими в почве, либо, как показывают некоторые исследования, вегетирующими в почвенных амебах. У хозяев-млекопитающих встречаются в различных тканях и биологических жидкостях организма, а также в клетках, способных к фагоцитозу. Хотя *C. neoformans* и *C. gattii* имеют много общих черт, касающихся структурного устройства клетки и ее физиологии, они, тем не менее, демонстрируют значительные различия в отношении географического распределения, занимаемых экологических ниш и особенностях клинической картины вызываемого заболевания. [2]

C. neoformans был впервые описан как патоген человека в конце 19-го века, однако до конца 1960-х сообщения о криптококкозе были единичными, и работ, посвященных этой проблеме, публиковалось чрезвычайно мало. Тем не менее, к 1970-м годам его распространение стало увеличиваться в связи с нарастанием числа больных онкологического профиля, внедрением в клиническую практику препаратов иммуносупрессивного действия и увеличением числа операций по трансплантации внутренних органов. Значительный прирост заболеваемости был отмечен в середине 1980-х,

причем более 80% случаев криптококкоза в мире приходилось на пациентов с ВИЧ-инфекцией. [3]

Заболеваемость криптококкозом в США до начала 1980-х составляла всего около 0,8 случаев на 1 миллион населения в год. К 1992 году, когда число новых пациентов с ВИЧ-инфекцией в стадии СПИДа достигло исторического максимума, в крупных американских городах регистрировалось около 5 случаев заболевания на 100 000 населения в год. В середине 1990-х годов еще до начала эры АРВТ, этот показатель значительно снизился и стабилизировался на уровне порядка 1 случая на 100 000 в год в связи с началом использования флуконазола в лечении орофарингеального кандидоза. Широкое распространение препаратов для этиотропной терапии ВИЧ-инфекции еще сильнее сократило прирост числа больных. К настоящему моменту, согласно данным Центра по контролю заболеваний (CDC, США), частота криптококкоза в общемировой популяции колеблется в интервале от 0,4 до 1,3 случаев на 100 000 населения в год. [4]

Наибольших значений показатель заболеваемости достигает в африканских странах, расположенных к югу от Сахары: по разным данным от 15 до 45% больных ВИЧ-инфекцией в стадии СПИДа обнаруживают признаки обсуждаемой патологии. В популяционном исследовании части населения Южной Африки, не имеющей доступа к АРВТ, общая заболеваемость криптококкозом у ВИЧ-инфицированных пациентов составила 95 случаев на 100 000 пациентов, а у больных в стадии СПИДа 14 на 1000. [5]

По данным отчета CDC, ежегодно в мире регистрируется около 1 миллиона новых эпизодов диссеминированного криптококкоза и более чем 600 000 летальных случаев, максимальных значений уровень смертности достигает, опять же, в странах Южной Африки (75-90% всех выявленных больных). В ряде медицинских центров этого региона *Cryptococcus neoformans* является наиболее частым этиологическим агентом менингитов, подтвержденных культуральными методами, опережая даже *Neisseria meningitidis* и

Streptococcus pneumoniae. [6] Естественное течение криптококкоза связано с летальностью, стремящейся к 100%, тем не менее, своевременно начатая терапия позволяет снизить этот показатель до 10-25%. [3]

Модели, оценивающие расчетные показатели заболеваемости криптококкозом, позволяют высказать предположения о снижении заболеваемости до уровня 200 000 случаев в год, а смертности до 100 000 при условии повсеместного распространения АРВТ. Среди факторов, лимитирующих скорость ежегодной убыли названных показателей, выделяют высокое число недиагностированных случаев ВИЧ-инфекции, распространение резистентности к отдельным антиретровирусным препаратам и низкий комплайенс пациентов, получающих АРВТ. [7]

Данные о числе больных криптококкозом по России в целом отсутствуют, единичные работы, посвященные обсуждаемой нозологии, отмечают рост заболеваемости в Санкт-Петербурге. [8]

Криптококковый менингит встречается преимущественно у лиц с дефектом клеточного звена иммунитета и является одной из наиболее распространенных оппортунистических инфекций среди пациентов с числом CD4⁺-клеток ниже 100 в 1 мкл. Благодаря все повышающейся доступности АРВТ заболеваемость ВИЧ-ассоциированным криптококкозом значительно снизилась в большинстве развитых стран, однако в иных группах риска она неизменна. По мере развития методов молекулярной биологии, формируется все более глубокое понимание факторов патогенности возбудителя, их адаптационных способностей и методов освоения новых экологических условий. Кроме того, к настоящему моменту активно исследуются механизмы развития криптококковой инфекции у иммунокомпетентных лиц. [3]

Совершенствование методов скрининга и схем терапии имеют хороший потенциал для контроля за распространением инфекции и, возможно, снижения глобального бремени заболевания в будущем.

Цели и задачи исследования

Целями настоящей работы стали обзор и оценка эффективности схем этиотропной терапии менингитов, вызванных *Cryptococcus neoformans*, использованных в СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» за период 2018-2019 гг. и проведение сравнительного анализа клинико-лабораторных показателей, выявляемых на фоне различных вариантов лечения.

В рамках поставленной цели были выделены следующие задачи:

1. Оценить стадию ВИЧ-инфекции, иммунологические показатели и сопутствующие оппортунистические инфекции в группе больных с верифицированным криптококковым менингитом.
2. Изучить неврологические проявления и особенности ликворограммы среди исследуемых лиц.
3. Произвести оценку динамики разрешения неврологической симптоматики и скорости санации ликвора, а также выживаемости и причин смерти в группах, получавших различные схемы этиотропной терапии.
4. Охарактеризовать токсическое действие используемых комбинаций препаратов.

Практическая значимость

В настоящем ретроспективном исследовании, представляющем собой анализ данных, которые были получены в ходе стационарного лечения пациентов с верифицированным криптококковым поражением ЦНС, проведена оценка особенностей иммунологического статуса исследуемых больных, определена частота коморбидных инфекционных заболеваний. Изучены особенности клинической картины и ликворологической характеристики обсуждаемой патологии. Произведена оценка динамики разрешения клинической картины и конверсии культуральных данных при использовании различных схем этиотропной терапии криптококкового менингита. Определен показатель

выживаемости и основные причины смерти среди исследуемых лиц. Путем сравнения интенсивности прироста креатинина и убыли гемоглобина выявлены различия токсического действия применяемых комбинаций препаратов.

В ходе анализа полученных данных выявлено более выраженное нефротоксическое и анемизирующее действие амфотерицина В дезоксихолата, в сравнении с липосомальной формой. Скорость обратного развития неврологической симптоматики, санации ликвора и выживаемость в исследуемых группах оказались неразличимы. Исходя из приводимых результатов, могут быть даны практические рекомендации по назначению L-АМВ пациентам с сопутствующей нефрологической патологией, в исходе которой возможно развитие ХБП: диабетическая и гипертоническая нефропатии, гломерулонефриты, тубулоинтерстициальные заболевания, поликистозная дегенерация, системные заболевания с вовлечением почечной паренхимы и некоторые другие. С целью профилактики анемизации у пациентов с исходно сниженными уровнями гемоглобина может быть рекомендовано заблаговременное назначение препаратов железа, а в случае невозможности достаточной компенсации дефицита – эритропоэтина, являющегося в данной ситуации патогенетически обоснованным средством терапии.

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют проводить более тонкий подбор лекарственных средств у пациентов с сопутствующей почечной патологией или высоким риском ее развития и представляют определенный интерес для повседневной клинической практики.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология криптококкоза

Таксономия возбудителей криптококкоза имеет следующий вид

царство: <i>Fungi</i>	порядок: <i>Tremellales</i>
отдел: <i>Basidiomycota</i>	семейство: <i>Tremellaceae</i>
класс: <i>Tremellomycetes</i>	род: <i>Cryptococcus</i> . [9]

1.1.1. Морфология возбудителя

Для представителей рода *Cryptococcus* свойственен мицелиально-дрожжевой диморфизм. В микологии мицелиальную и дрожжевую формы традиционно выделяют в два различных вида (при том, что формально их геном идентичен). Половая телеоморфная стадия гриба *Filobasidiella spp.* способна к формированию гиф и встречается преимущественно в помете птиц. В организме человека развивается бесполоая дрожжевая стадия – анаморфа, относящаяся к роду *Cryptococcus*. [10] К настоящему моменту внутри описываемого рода выделяют более 30 видов организмов, убиквитарно распространенных в окружающей среде. Доказанными патогенами для человека являются лишь два из них: *C. neoformans* и *C. gattii*. Первый вызывает заболевание как у иммунокомпрометированных пациентов, так и у лиц без выявленного иммунодефицита, второй – патоген преимущественно иммунокомпетентных людей. [11,12]

На микроскопии клетки *Cryptococcus spp.* определяются как капсулированные сферические дрожжи. Средний размер клеток варьирует в пределах 5-7 мкм. Тем не менее, в препаратах нередко обнаруживаются атипичные морфологические формы: титановые клетки (англ «titan cells»/ «giant cells») и микроклетки (англ. «micro-cells» / «drop cells»). Титановые клетки имеют размер, превышающий 12 мкм (без учета капсулы). Они полиплоидны, имеют выраженную капсулу и утолщенную клеточную стенку, которая содержит в

своей структуре увеличенное количество хитина. Титановые клетки выполняют роль своеобразных «точек размножения» в очагах первичных легочных инфектов. [13]

Размер микроклеток колеблется в интервале 2-4 мкм, их клеточная стенка, напротив, истончена. Ряд исследователей полагают, что такая особенность является адаптационной для существования внутри фагосом макрофагов. К настоящему моменту эта морфологическая форма изучена слабо, полагают, что такие клетки являются метаболически неактивными и могут играть важную роль в латентном течении инфекции и ее рецидивах. [14]

Размер капсулы зависит от штамма и условий культивирования. Разработана система ранжирования степени выраженности капсулы в зависимости от ее толщины: слабо капсулированные формы - **2 – 5 мкм**, средне капсулированные - **4 – 10 мкм** и, наконец, сильно капсулированные - до **80 мкм**. Варианты морфологии дрожжевых форм возбудителя представлены на рисунке 1.

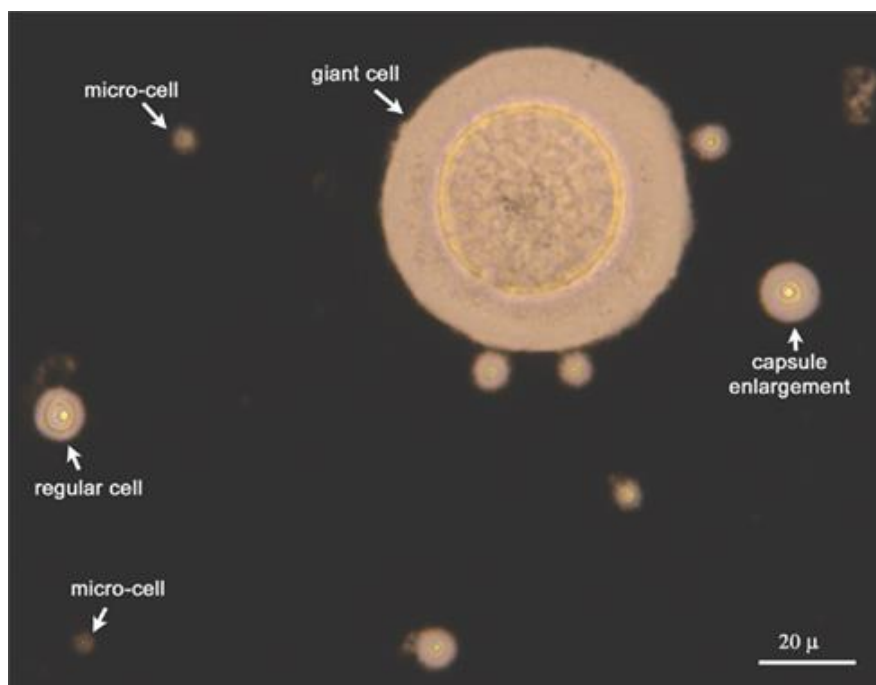


Рисунок 1. Препарат, полученный из легочной ткани зараженной мыши, демонстрирует разнообразие морфологических форм возбудителя. Окраска тушью (India ink) [15]

1.1.2. Факторы патогенности

Факторы патогенности криптококков весьма разнообразны, а благодаря внедрению в исследовательскую практику методов молекулярной биологии их список постоянно пополняется. Среди прочих, в качестве «классических» выделяют способность синтезировать компоненты капсулы, выработку меланинового пигмента и терморезистентность. [16]

а) Капсула

Полисахаридная капсула возбудителя, состоящая преимущественно из глюкуроноксиломаннана (GXM) и глюкуроноксиломанногалактана (GXMGal) является уникальной по своей организации и оказывает множественное влияние на иммунитет человека; она способна значительно увеличиваться в размерах при взаимодействии с тканями и биологическими жидкостями хозяина.

Ввиду необходимости обеспечения прочной связи между компонентами капсулы и поверхностью клеточной стенки, последняя приобрела своеобразную усложненную структуру, включающую в себя 2 слоя, внутренний и наружный.

Внутренний представлен хитином, хитозаном, β -глюканами, меланином и надмембранными доменами мембранных белков. Наружный – α -глюканами, опосредующими фиксацию капсулы к стенке. Клеточная стенка титановых клеток несет дополнительный «сшивающий» (англ. cross-linked) слой, заключенный между α - и β -глюканами и состоящий из маннанных фибрилл, ориентированных поперечно к поверхности клетки. Такая особенность позволяет усилить каркасные свойства стенки и придать ей дополнительную жёсткость. Сравнение ультраструктуры поверхностей типичной морфологической формы и титановой клетки представлено на *рисунке 2*. [17]

Клетки, лишенные капсулы, являются авирулентными. Кроме того, были получены многочисленные мутанты с дефектами синтеза компонентов

капсулы, многие из которых демонстрировали снижение вирулентности в ходе моделирования инфекционного процесса на лабораторных животных. Было показано, что отдельные компоненты капсулы ингибируют фагоцитоз криптококков и другие иммунные реакции хозяина.

Изучение механизмов синтеза капсулы является перспективным направлением, способным предложить новые мишени для химиотерапии этого заболевания. [18]

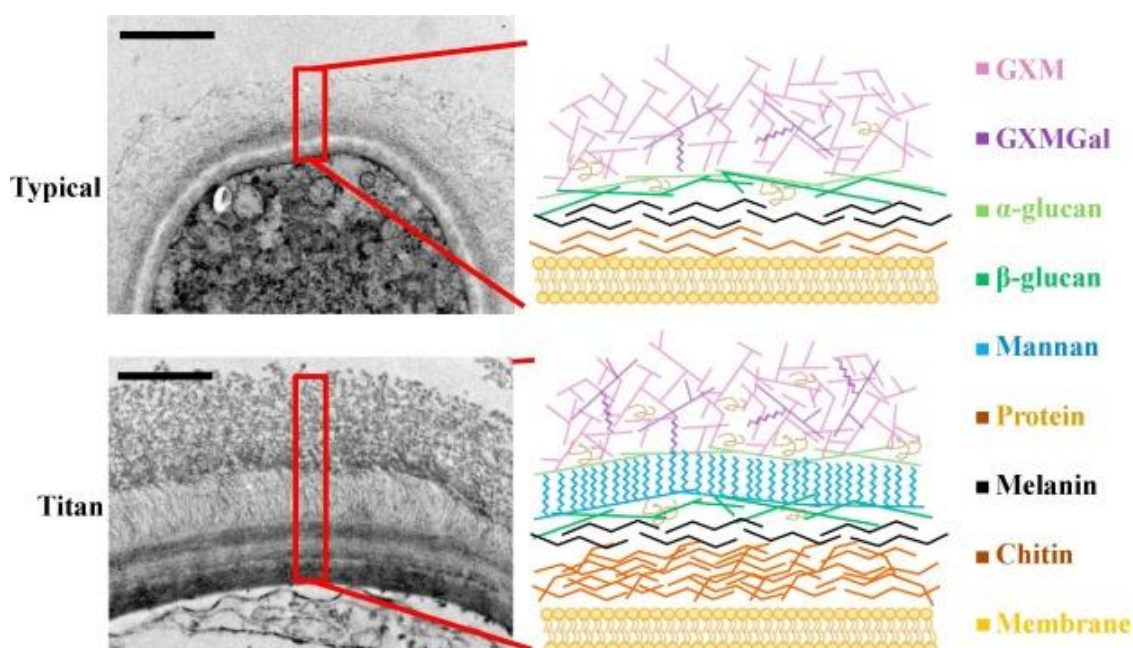


Рисунок 2. Данные электронной микроскопии и схематическое изображение ультраструктур поверхностей клеток типичной морфологической формы криптококка и титановой клетки. [19]

б) Продукция меланина

C. neoformans обладает ферментом лакказой, катализирующей превращение дифенольных соединений в меланин. Этот процесс может играть роль в защите дрожжей от факторов окислительного стресса, а также частично объясняет нейротропизм возбудителя высокими концентрациями дифенольных катехоламинов в ЦНС.

Экспериментально доказано, что при условии наличия в среде соединений-предшественников (в частности, L-дигидроксифенилаланина – L-DOPA) *S. neoformans* способен к продукции меланина *in vitro*. Образующееся соединение обеспечивает защиту от стрессовых факторов внешней среды, в том числе от некоторых противогрибковых препаратов. Лакказа, катализирующая образование меланина, также была предложена в качестве терапевтической мишени. [21,22]

с) Терморезистентность

Наконец, ключевой особенностью большинства патогенных для человека грибов, включая *Cryptococcus spp.*, является способность роста при температурах, близких к 37 °С. Использование молекулярно-биологических методов позволило связать возможность активного роста при столь высоких для подобных организмов температурах с особенностями отдельных ферментов и целых метаболических путей, которые в ходе эволюции были приобретены или адаптированы для усиления патогенности в отношении млекопитающих. [16]

d) Другие факторы патогенности

Помимо названных, к факторам патогенности криптококков относят также способность к продукции фосфолипазы, протеазы и супероксиддисмутазы, что обуславливает высокую устойчивость микроорганизмов к окислительному стрессу в условиях фаголизосомы макрофага.

Другим фактором, влияющим на вирулентность, является производство маннита, что связывают с повышенной устойчивостью к осмотическому, тепловому и окислительному стрессу. [23]

1.1.3. Антигенная структура

Исторически род *Cryptococcus* был разделен на 3 биовара, 5 серотипов (на основании различий антигенных свойств полисахаридной капсулы) и 8 генотипов. Актуальная классификация представлена в *таблице 1*.

Таблица 1. Современная классификация патогенных видов рода Cryptococcus

Серотип	Виды и биовары	Молекулярные типы по результатам RFLP
A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VN I, VN II
B	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
C	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VN IV
AD	<i>C. neoformans</i>	VN III

Методы секвенирования нового поколения позволили значительно расширить представления о степени генетического разнообразия внутри рода. Накопление данных о наследственном материале этих дрожжей с течением времени привело к пересмотру таксономической структуры рода и выделению *C. gattii* в отдельный вид.

Также к настоящему моменту было проведено молекулярное типирование отдельных сероваров, которое позволяет с большей точностью идентифицировать возбудителя. В работах с использованием методов RFLP-анализа (англ. Restriction fragment length polymorphism) предлагается еще более сложная классификация, в основе которой лежат различия в структурах генетического кода организмов. [24]

1.2. Эпидемиология

Заражение обусловлено аэрозольным механизмом и воздушно-пылевым путем передачи. Некоторые авторы описывают казуистические случаи реализации контактного механизма путем травматической инокуляции возбудителя в мягкие ткани.

Приблизительно 95% случаев криптококковой инфекции вызвано штаммами *C. neoformans* (серотип А), а оставшиеся 4-5% приходятся на *C. neoformans* (серотип D) и *C. gatti* (серотипы В/С). *C. neoformans var. grubii* (серотип А) распространен повсеместно, в то время как *C. neoformans var. neoformans* (серотип D) встречается преимущественно в европейских странах. [39] В некоторых регионах Южной Африки, - преимущественно в Ботсване и прилегающих территориях - где сосуществуют *C. neoformans* и *C. gatti* были зарегистрированы случаи межвидового полового размножения с формированием гибридных форм *C. neoformans* × *C. gattii*. [40] Существование *C. neoformans* в природе довольно тесно ассоциировано с птицами и особенно с голубями, в помете которых он нередко обнаруживается. Организм также может вегетировать в задней кишке мокриц и внутри фагосом почвенных амёб. Свободноживущие формы обитают преимущественно в почве, реже на коре и в дуплах деревьев. [41]

Криптококковый менингит встречается преимущественно у лиц с дефектом клеточного звена иммунитета и является одной из наиболее распространенных оппортунистических инфекций среди пациентов с числом CD4⁺-клеток ниже 100 в 1 мкл. Благодаря все повышающейся доступности АРВТ заболеваемость ВИЧ-ассоциированным криптококкозом значительно снизилась в большинстве развитых стран, при этом в других группах риска (таблица 2) она остается стабильной. [42]

Таблица 2. Факторы риска развития криптококкоза

ВИЧ-инфекция	Ревматологические заболевания, в частности, РА и СКВ ¹
Приём ГКС и/или иммуносупрессантов	Идиопатическая CD4+-лимфопения
Реципиенты трансплантатов внутренних органов ¹	Хронические заболевания печени в фазе декомпенсации
Онкологические и лимфопролиферативные заболевания ¹	ХБП и/или перитонеальный диализ
Саркоидоз	Иммунодефициты с повышенным содержанием иммуноглобулинов М или Е
Лечение моноклональными антителами (этанерцепт, инфликсимаб, алемтузумаб)	Сахарный диабет
Выявление у пациента антител к ГМ-КСФ	-

¹Риск связан в том числе с терапией иммуносупрессантами, показанной названных состояниях.

Хотя *C. neoformans* способны вызывать заболевания у лиц без выявленного иммунодефицита, доля инфекций, обусловленных *C. gattii*, у таких пациентов значительно выше. [3]

Наиболее масштабным исследованием, изучившим распространенность криптококкового менингита и ассоциированную с ней величину показателя летальности, стала работа Park и соавторов, оценивших более чем миллион случаев криптококкового менингита, вызванного *C. neoformans*. Подавляющее число больных регистрировалось в странах Африки к югу от Сахары и в других развивающихся регионах, где доступ к АРВТ и иным ресурсам здравоохранения ограничен несовершенством инфраструктуры и их относительно высокой стоимостью. [43] Сравнение числа умерших от различных инфекционных болезней в изучаемый период времени представлен на рисунке 3.

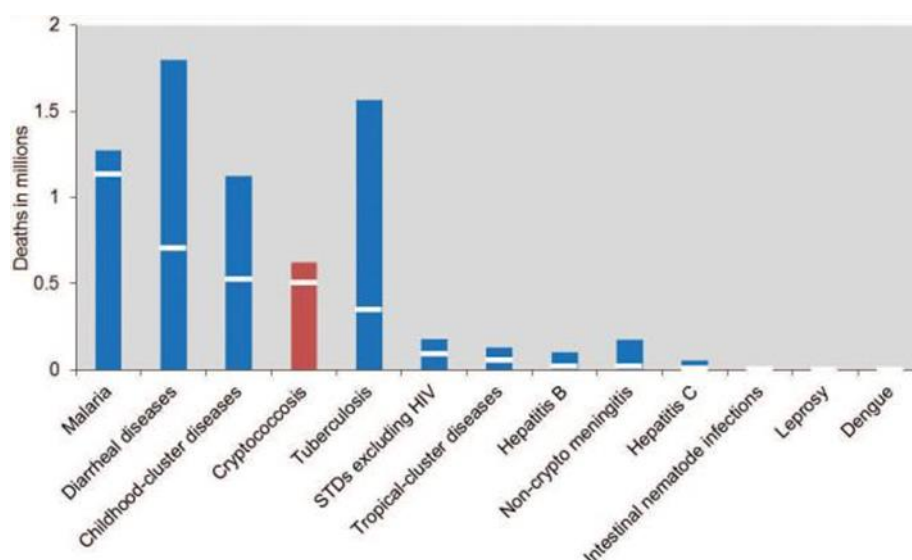


Рисунок 3. Сравнение чисел смертельных исходов от инфекционных заболеваний в мире (общая высота столбцов) и в Африке (до белой линии). [43]

1.3. Патогенез

По преимуществу респираторный тракт является входными воротами для *Cryptococcus neoformans*. В результате ингаляции базидиоспор или инкапсулированных дрожжевых клеток, за которым следует их попадание в альвеолы, формируется первичный легочный очаг. В подавляющем большинстве случаев у иммунокомпетентных лиц течение первичной легочной инфекции бессимптомное ввиду быстрой элиминации микроорганизма в очаге, однако в некоторых ситуациях возможно длительное существование возбудителя в организме без развития клинической картины. [25]

На этапе формирования первичного легочного очага ключевую роль во взаимодействии иммунной системы хозяина с инфекционным агентом играют альвеолярные макрофаги. Криптококки способны избежать поглощения за счет антифагоцитарных свойств капсулы, либо путем трансформации в атипичную морфологическую форму – полиплоидную титановую клетку. Последняя, во-первых, имеет весьма крупные размеры, - 12 мкм и более, в то время как средний размер человеческого альвеолярного макрофага составляет

около 21 мкм – а во-вторых, более ригидную, по сравнению с типичными формами, стенку за счет обсуждаемого ранее «сшивающего» слоя маннанных фибрилл. [26]

В том случае, если поглощение все же произошло, криптококки способны подавить завершение фагоцитоза за счет продукции супероксиддисмутазы, катализирующей диспропорционирование супероксида фаголизосомы в кислород и пероксид водорода, и других ферментов, инактивирующих активные формы кислорода. Для большинства штаммов возбудителя возможность внутриклеточной персистенции реализуется лишь в случае наличия у хозяина иммунодефицита. [27] *Cryptococcus* spp. способны длительное время существовать внутри фаголизосом макрофагов, поддерживая, таким образом, очаги латентной инфекции, которые имеют вид гранулем, локализованных во внутригрудных лимфоузлах. [28]

В исходе фазы внутриклеточной пролиферации может иметь место одно из двух событий: лизис макрофага хозяина, сопровождающийся выходом криптококков во внеклеточную среду, либо реализация нелитического механизма «побега» за счет изменения проницаемости мембраны фаголизосомы. Такой процесс, называемый вомоцитозом, опосредует возможность передачи дрожжей от клетки к клетке (англ. cell-to-cell transfer) и проникновение возбудителя через гистогематические барьеры (англ. compartment transfer) без повреждения макрофагов хозяина. [29] Ключевую роль в модификации проницаемости мембран играют фосфолипаза В1 возбудителя [30] и уже упомянутый фермент лакказы, катализирующий синтез меланина из дифенольных соединений. [31] Структура взаимодействия клеток возбудителя с альвеолярными макрофагами представлена на *рисунке 4*.

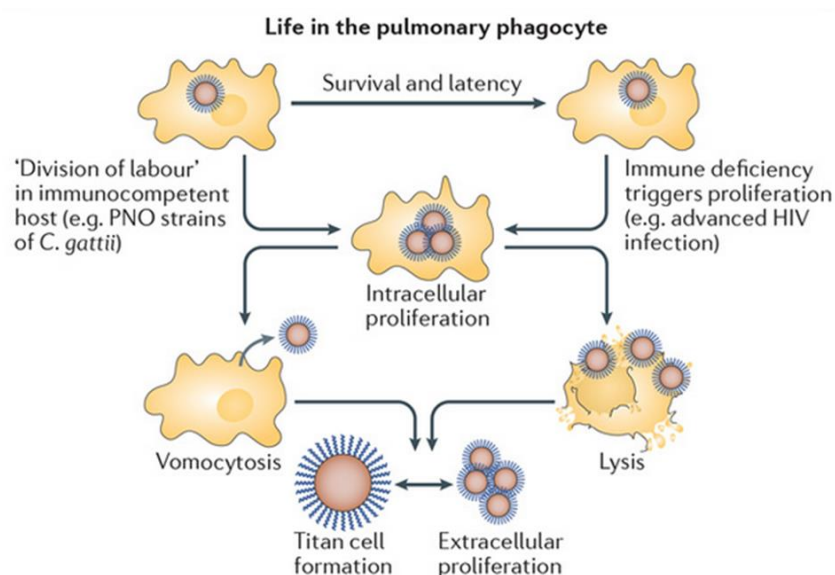


Рисунок 4. Судьба поглощенного альвеолярным макрофагом криптококка и возможные пути его высвобождения. [32]

По мере нарастания популяции возбудителя в легочном очаге, может происходить его диссеминация в другие органы и ткани, при этом криптококки демонстрируют выраженную тропность к ЦНС.

Проникновение через ГЭБ возможно за счет реализации одного из трех механизмов:

- 1) парацитоз - протискивание (англ. squeezing) возбудителя между эндотелиальных клеток за счет нарушения целостности плотных контактов, которое, в свою очередь, обусловлено воздействием на их компоненты грибковой металлопротеазы Mpr1 и уреазы; [33]
- 2) транцитоз, опосредуемый взаимодействием молекул гиалуроновой кислоты капсулы криптококка с рецептором CD44 на поверхности эндотелиоцита; [34]
- 3) и, наконец, наиболее оригинальный механизм «тройного коня»: обусловлен возможностью миграции через ГЭБ макрофагов, несущих внутри фагосом клетки возбудителя. [35] Данная теория нашла подтверждение в экспериментах на мышах с истощенным пулом альвеолярных макрофагов:

проникновение возбудителя в ЦНС у таких организмов значительно снижено. [36]

Хотя модели парацитоза, транскитоза и «троянского коня» принципиально различны, полагают, что все описанные механизмы миграции возбудителя через ГЭБ реализуются совместно.

Количество данных о физиологии *C. neoformans* после преодоления ГЭБ ограничено. Тем не менее, исследование транскриптома изолятов микроорганизма, выделенных из СМЖ, показало, что возбудитель имеет высокую метаболическую активность в столь бедной питательными веществами среде. Любопытно, что попытки выращивания криптококков в ликворе *ex vivo* не позволили добиться таких значительных показателей. Сохранение высокой интенсивности обменных процессов имеет важное значение для дальнейшего развития заболевания: синтез GXM и GXMGal весьма энергозатратный процесс, а тяжесть поражения нервной ткани имеет прямую корреляцию со степенью выраженности полисахаридной капсулы. [37,38]

1.4. Клиническая картина

К настоящему моменту доказано, что для *C. neoformans* характерна прогрессирующая гранулематозная легочная инфекция с последующей диссеминацией в ЦНС. В структуре клинической картины криптококкоза симптомы поражения легочной паренхимы, ткани головного мозга и его оболочек закономерно преобладают. Вместе с тем работы, описывающие специфику течения рассматриваемого заболевания, указывают на высокую частоту бессимптомных форм: лишь порядка 36% пациентов обнаруживали клинические признаки патологии органов дыхания, в 51% случаев выявлялись симптомы поражения ЦНС. Приведенные данные указывают на преобладание асимптоматического течения до момента наступления генерализации инфекции с формированием экстрапульмональных очагов отсева, которые в

более редких случаях могут иметь вид локальных поражений кожи, глаз, миокарда, костей, суставов, простаты и мочевого тракта. [44]

а) Лёгочная инфекция

В типичном случае входными воротами для криптококковой инфекции является респираторный тракт. Клинические проявления легочного криптококкоза могут варьировать от бессимптомного носительства до пневмонии тяжелого течения, осложненной острым респираторным дистресс-синдромом. В качестве независимых факторов риска развития настоящей формы заболевания рассматривают сопутствующую легочную патологию инфекционной (туберкулез, нокардиоз) и неинфекционной (легочный альвеолярный протеиноз) этиологии. У пациентов без иммуносупрессии, имеющих другие хронические легочные заболевания наиболее частой формой персистенции криптококка является хроническая эндобронхиальная колонизация, характеризующаяся положительными данными культурального исследования мокроты на предмет наличия возбудителя, при отсутствии клинических и рентгенологических признаков активного паренхиматозного поражения, отрицательных результатах серологического исследования венозной крови и данных посевов мочи и ликвора. [45]

Среди симптомов поражения органов дыхания у ВИЧ-позитивных пациентов с верифицированным легочным криптококкозом выделяют боли в грудной клетке у 67% больных, кашель – у 58%, одышку – у 46%. Также обнаруживаются неспецифические проявления лихорадочно-интоксикационного синдрома: лихорадка в 92% случаев, головная боль (при отсутствии данных о поражении ЦНС) – в 36%, снижение массы тела – в 18%. Чрезвычайно скудны данные физикального обследования: аускультация оказывается информативной лишь в 10-15% случаев. В связи с этим возрастает диагностическая роль микроскопического исследования мокроты и рентгенографии. Несмотря на возможность длительного персистирования возбудителя в легочной ткани без каких бы то ни было клинических

проявлений, в случае развития симптомной формы заболевания от момента возникновения первых признаков болезни до развернутой клинической картины пневмонии проходит не более 5-7 дней. Вместе с тем, в группе иммунокомпрометированных больных отмечается явное преобладание интоксикационно-лихорадочного синдрома над респираторной симптоматикой. Более чем в 90% случаев легочная форма криптококкоза диагностировалась совместно с церебральной, то есть обнаруживалась уже после генерализации инфекции. [46]

Среди возможных осложнений заболевания рассматривают формирование полостей распада, эмпиемы плевры, пневмоторакса и острого респираторного дистресс-синдрома, являющегося наиболее редким, но, вместе с тем, наиболее грозным исходом такого рода патологии. Смертность от изолированной респираторной формы невысока и составляет по разным данным лишь 0,5-0,8% случаев. Непосредственная причина гибели пациентов – острая дыхательная недостаточность. [45]

Особую сложность в диагностике представляют случаи ко-инфекции пневмоцистоза и криптококкоза, которые чаще осложняются дыхательной недостаточностью, имеют почти идентичную с моноинфекцией *P. jirovecii* рентгенологическую картину и требуют включения в схемы этиотропной терапии Бисептола. Среди пациентов с числом CD4⁺-клеток менее 100 в 1 мл также выявляются случаи симультанного течения криптококкоза с туберкулезом, микобактериозами, нокардиозом и цитомегаловирусной пневмонией. Литературные данные о подобного рода заболеваниях малочисленны и не позволяют выделить в их течении закономерных особенностей клинической картины. [47]

б) Поражение ЦНС

Варианты клинического течения криптококкового менингита представлены острой, подострой и хронической формами. Первый вариант, сопровождающийся быстрым – в течение нескольких дней – развитием клинической картины, выраженными общемозговыми и менингеальными симптомами относительно редок. В большинстве случаев определяется подострое или хроническое (длительностью более 4 недель) течение, при этом симптомы раздражения мозговых оболочек у пациентов не выявляются или выражены нерезко. Клинические проявления криптококкового поражения ЦНС включают множество симптомов, среди которых наиболее распространены следующие:

- головная боль – 98%;
- лихорадка – 97%;
- черепные невралгии – 76%;
- нарушения памяти – 41%;
- летаргия – 18%;
- расстройства менструации – 11%. [25]

Частота выявления менингеальных знаков значительно варьируется в работах разных авторов: от 34 до 91% больных обнаруживают подобные симптомы в различных выборках. Среди пациентов с церебральным криптококкозом, протекающим на фоне ВИЧ-инфекции, клинические признаки поражения мозговых оболочек выявляют примерно в 35-40% случаев. При этом абсолютное большинство этих случаев соответствовали критериям острого течения болезни. [3,5,44-47]

Характер головной боли также может быть различным: постоянная, в случае острого течения, или перемежающаяся при иных формах. Если пациент не обнаруживает данного симптома, можно говорить об атипичной форме заболевания, при этом почти всегда в случае его отсутствия можно выявить признаки нарушения сознания. [44]

Наиболее часто среди черепно-мозговых нервов поражается II пара – n. opticus. В числе клинических проявлений выделяют фотофобию и диплопию, морфологическим субстратом которых является папилледема, а также паралич нерва и временную или постоянную потерю зрения. Названные симптомы развиваются как в связи с прямой инфильтрацией клетками возбудителя ствола нерва, так и по причине повышения внутричерепного давления. Наиболее тяжелое осложнение – слепота – может возникать не только на фоне естественного течения заболевания, но и быть осложнением воспалительного синдрома восстановления иммунитета (ВСВИ), являющегося следствием старта приема АРВТ. [48] Нарушения памяти, как правило, проявляются в виде ретроградной амнезии, охватывающей события от 1 до 3 недель, предшествовавших началу заболевания. [44]

Одним из наиболее сложных этапов клинической диагностики церебрального криптококкоза является различие прогрессирования менингоэнцефалита и ВСВИ. Среди причин развития последнего выделяют остро развивающуюся интоксикацию компонентами капсулы возбудителя, которая возникает вследствие лизиса значительного числа клеток микроорганизма за относительно короткий промежуток времени. Выделяют две клинические формы синдрома: демаскирующая (англ. unmasking) и парадоксальная. При развитии демаскирующей формы сразу после старта АРВТ у больных развивается клиническая картина острого менингита, иногда сопровождающаяся увеличением размеров периферических и средостенных лимфоузлов. Парадоксальная форма проявляется развитием схожих симптомов по прошествии нескольких недель или месяцев от момента начала приема пациентом АРВТ. Клинически различить ВСВИ и прогрессирование менингита представляется возможным далеко не всегда, с этой целью рекомендуют проводить культуральное исследование ликвора и аспирационных биоптатов лимфоузлов, которые при синдроме восстановления иммунитета оказываются стерильными. Для профилактики

описанного состояния используют отсрочку старта АРВТ на 4 недели от момента начала приема антимикотиков. [49]

Среди возможных осложнений криптококкового поражения ЦНС выделяют развитие специфических криптококковых гранулем – криптококком – головного мозга, которые манифестируют развитием очаговой симптоматики. Подобные образования могут также обнаруживаться и в спинном мозге, осложняя клиническую картину заболевания развитием центральных парезов и параличей. У пациентов с недостаточным ответом на антифунгальную терапию раннее нейрохирургическое вмешательство, используемое для контроля давления и уточнения диагноза, повышает вероятность скорейшего излечения. [44,50]

Прогрессивное нарастание ВЧД с течением времени становится причиной компрессии системы дренажных лимфатических сосудов паутинной оболочки и развития обструктивной гидроцефалии. Остро развивающееся состояние приводит к развитию нарушений сознания разной степени выраженности: от оглушения до глубокой комы. Следствием хронической гидроцефалии является гибель наиболее чувствительных к гипоксии клеток коры больших полушарий с развитием деменции. Непосредственной причиной смерти больных с церебральным криптококкозом, как правило, является острый отек-набухание головного мозга, в более редких случаях острая дыхательная недостаточность или шок вследствие разрушения дыхательного и сосудодвигательного центров ствола нарастающей в объеме гранулемой. [50]

1.5. Лабораторная диагностика

Окончательный диагноз криптококкоза ставится лишь после выделения культуры микроорганизма из биологического материала или прямого обнаружения возбудителя с помощью микроскопии окрашенных тушью препаратов биологических жидкостей. Кроме того, для верификации диагноза могут быть использованы методы патоморфологии и серологии.

Молекулярно-биологические исследования, широко используемые в исследовательских целях, в настоящее время не применяются в рутинной клинической практике из-за своей дороговизны.

а) Микроскопия

Наиболее быстрым методом, используемым в диагностике криптококкового менингита, является прямое микроскопическое исследование препаратов СМЖ, окрашенных тушью. *C. neoformans* визуализируются как глобулярные инкапсулированные дрожжевые клетки, иногда почкующиеся, размером от 5 до 20 мкм в диаметре.

Чувствительность описанного метода зависит от грибковой нагрузки и варьирует от 30 до 50% у больных криптококковым менингитом, не связанным с ВИЧ-инфекцией и достигает до 80% у ЛЖВ. Ложноположительные результаты связаны с возможным попаданием в поля зрения нежизнеспособных клеток возбудителя, а также с некоторой схожестью лимфоцитов и дрожжей в окрашенных препаратах. Все это ограничивает диагностическую ценность микроскопического метода исследования. [21]

б) Культуральные исследования и идентификация возбудителя

C. neoformans может быть выделен из образцов биологических материалов, таких как СМЖ, мокрота, биоптаты кожи, на питательных средах, используемых в рутинной практике. Однако для ускорения процесса идентификации возбудителя предпочтительно использование селективного агара Стейба (Staib's Medium / Bird Seed Agar). Входящие в состав семена *Guizotia abyssinica*, креатинин и глюкоза являются источниками питательных веществ для роста криптококков, а хлорамфеникол подавляет рост бактерий и быстрорастущих грибов.

У взрослых с ВИЧ-ассоциированным криптококковым менингитом посевы СМЖ и крови являются положительными в 90% и 70% случаев соответственно.

На агаризованных питательных средах колонии обнаруживаются через 48-72 часа инкубации в аэробных условиях, при температуре 30-35°C и выглядят как непрозрачные налеты, имеющие цвет от белого до кремового, с течением времени они темнеют, становясь терракотовым или коричневыми. Степень выраженности слизистого покрова колонии связана с размерами капсул отдельных клеток, её образующих.

Несмотря на относительно быстрый рост большинства штаммов, результат культурального исследования может быть расценен как отрицательный лишь по прошествии 4 недель, это особенно актуально при проведении анализа материала, полученного от пациентов, принимающих антифунгальную терапию. [51]

с) Цитологическое и патоморфологическое исследования

Обнаружение *C. neoformans* может быть осуществлено с помощью окраски биоптатов тканей легкого, кожи, костного и головного мозга. Возможно использование цитологических методов для идентификации возбудителя в центрифугированном осадке СМЖ и других биологических жидкостей. Чувствительность названных методик достоверно выше, чем в случае микроскопии образцов СМЖ, окрашенных тушью. [52]

C. neoformans определяются как дрожжевые клетки, в ряде случаев можно наблюдать картину почкования, при этом дочерние организмы могут некоторое время сохранять связь с материнским посредством узкой ножки. Возбудитель идентифицируются при помощи специальных красителей, окрашивающих капсулу. Наиболее широко используются муцикармин, реактив Шиффа и альциановый синий. Окрашивание по методу Фонтана-Массон позволяет обнаружить меланин, заключенный в клеточной стенке микроорганизма. [53] В микологической практике также широко используются окраска метенамином серебра по Гомори, с помощью которой

можно визуализировать клеточную стенку гриба и калькофлюор белый, селективно окрашивающий хитин. [54]

d) Серологические методы

Диагностика криптококковой инфекции значительно улучшилась с разработкой серологических тестов, направленных на обнаружение полисахаридного криптококкового капсулярного антигена (CrAg). Методы латекс-агглютинации и иммуноферментного анализа к настоящему моменту широко доступны, при этом разработаны системы для исследования как сыворотки, так и СМЖ. До недавнего времени латекс-агглютинация была наиболее распространенной методикой экспресс-диагностики, ее чувствительность по данным разных авторов колеблется от 93 до 100%, а специфичность от 93 до 98%. [55]

К настоящему моменту в клиническую практику начинают внедряться тесты, основанные на технологии иммунохроматографического анализа (англ. lateral flow assay) с использованием ферментных меток. В частности, в США широкое распространение получила система Premier Cryptococcal Antigen (Meridian Biosciences). Проведенные параллельно в нескольких лабораториях исследования показали, что чувствительность и специфичность данного метода при анализе сыворотки крови и СМЖ превышает 98%, при анализе мочи чувствительность составляет 85%. [56,57]

Такие полуколичественные анализы с использованием тест-полосок имеют целый ряд преимуществ по сравнению с другими серологическими методиками, к ним относят быстроту выполнения (около 15 минут), минимальные требования к лабораторному оборудованию, стабильность при комнатной температуре, низкая стоимость и наиболее широкий охват всех вариантов капсульных полисахаридов *C. neoformans*. [57]

Титры криптококкового полисахаридного антигена в сыворотке и СМЖ коррелируют с грибковой нагрузкой и имеют прогностическое значение у

пациентов с криптококковым менингитом. Однако ценность мониторинга титра антигена для оценки ответа на лечение ограничена. Особенности кинетики клиренса антигена таковы, что скорость снижения титра запаздывает за скоростью гибели клеток возбудителя, поэтому в клинической практике используются более точные в данном контексте культуральные исследования. Культуральные методы, являясь количественными, довольно точно описывают эффективность антимикотической терапии и могут быть использованы для оценки используемых режимов лечения. [58]

1.6. Лечение

Несмотря на глобальное распространение криптококкоза, лечение этого заболевания по-прежнему остается серьезной проблемой, ввиду весьма ограниченного арсенала терапевтических средств, многим из которых уже много десятилетий. Эффективность современных режимов лечения невысока, и несмотря на всё расширяющийся доступ к АРВТ, смертность от острого криптококкового менингита (текущего менее 3 месяцев) остается на уровне 35-40%, причем такие цифры характерны как для развивающихся, так и для экономически развитых стран. [59]

1.6.1. Используемые препараты

К настоящему моменту лишь три класса антимикотиков используются для лечения криптококкоза: полиены (амфотерицин В), азолы (флуконазол, итраконазол) и антиметаболиты урацила (флуцитозин – 5-FC).

Амфотерицин В обладает фунгицидным действием. Его молекулы связываются с эргостеролом плазмолеммы криптококка и формируют в ней поры, которые становятся причиной гибели клетки от окислительного и осмотического стресса. [60]

5-FC после попадания в грибковую клетку дезаминируется посредством специфической цитозиндезаминазы до 5-фторурацила, который затем ингибирует тимидилатсинтетазу и блокирует синтез ДНК, или превращается в

5-фторуридинтрифосфат, который включается в РНК и нарушает синтез белка, что обуславливает фунгистатическую активность препарата. [61]

Флуконазол, обладая преимущественно фунгистатическим действием, ингибирует СYP450-зависимую 14 α -деметилазу, необходимую для превращения ланостерола в эргостерол, ключевой компонент клеточной мембраны грибковой клетки. [62]

1.6.2. Практические аспекты лечения

а) Базовые принципы

Амфотерицин В является краеугольным камнем лечения криптококковой инфекции. Применяемые режимы терапии представлены в *таблице 3*.

Стандартная стартовая доза составляет 0,7-1,0 мг/кг/сут. Липосомальный амфотерицин В (L-AMB) в дозе 3,0-6,0 мг/кг/сут и амфотерицина В липидный комплекс (ABLC) в дозе 5,0 мг/кг/сут обладают сходным фунгицидным эффектом при меньшей нефротоксичности. Липосомальный амфотерицин В является препаратом выбора для старта терапии у пациентов с риском развития почечной недостаточности. [63]

Флукцитозин (5-FC) используется в комбинации с AmBd в качестве терапии первой линии при криптококковом менингите или тяжелом течении легочного криптококкоза в дозировке 100 мг/кг/сут. Такая комбинация представляет собой наиболее мощный фунгицидный режим с самой быстрой стерилизацией СМЖ и наименьшим количеством рецидивов. [64]

Ранняя микологическая неудача, определяемая как положительный результат культурального исследования СМЖ на 14-й день, имеет доказанную корреляцию с поздней неудачей лечения и плохим исходом, а отсутствие в схеме лечения 5-FC связано и с ранней, и с поздней микологической неудачами. [65,66]

Повышение фунгицидной активности при комбинировании AmBd с 5-FC в сравнении с монотерапией AmBd имеет своим следствием доказанное снижение смертности пациентов от криптококкового менингоэнцефалита. Доза 5-FC должна быть скорректирована у пациентов со сниженной СКФ из-за опасности угнетения функции красного костного мозга. [67]

Таблица 3. Схемы терапии ВИЧ-ассоциированного криптококкового менингоэнцефалита.

Препарат	Продолжительность
<i>Индукционная терапия</i>	
Основной режим	
AmBd (0,7-1,0 мг/кг/сут) + 5-FC (100 мг/кг/сут) ^a	2 нед
Альтернативные режимы ^b	
Если имеются противопоказания к 5-FC или он недоступен: AmBd (0,7-1,0 мг/кг/сут) или L-AMB ^c (3,0-4,0 мг/кг/сут), или ABLC (5,0 мг/кг/сут)	4-6 нед
AmBd (0,7-1,0 мг/кг/сут) + флуконазол (800 мг/сут)	2 нед
Флуконазол (≥ 800 мг/сут, предпочтительно 1200 мг/сут) + 5-FC (100 мг/кг/сут)	6 нед

Флуконазол (800-2000 мг/сут, предпочтительно 1200 мг/сут)	10-12 нед
Итраконазол (200 мг 2 раза в сутки)	10-12 нед
<i>Консолидирующая терапия</i>	
Флуконазол (400 мг/сут)	8 нед ^d
<i>Поддерживающая терапия</i>	
Флуконазол (200 мг/сут)	≥1 года ^e
<i>Альтернативные схемы^a</i>	
Итраконазол (200 мг 2 раза в сутки)	≥1 года ^e
AmBd (1 мг/кг 4 раза в неделю)	≥1 года

Сокращения: **5-FC**, флуцитозин; **ABLC**, амфотерицина В липидный комплекс; **AmBd**, амфотерицина В дезоксихолат; **L-AMB**, липосомальный амфотерицин В.

^a L-AMB, 3-4 мг/кг/сут или ABLC, 5 мг/кг/сут для пациентов с риском развития почечной недостаточности.

^b Может рассматриваться как альтернативный режим, когда основной недоступен, тем не менее, замена не эквивалентна.

^c Максимальная суточная доза L-AMB составляет 6 мг/кг/сут.

^d Старт АРВТ должен состояться приблизительно через 4 недели после начала антимикотической терапии.

^e Через 1 год терапии, в случае успешного ответа на АРВТ, критерием которого является уровень CD4⁺-клеток ≥ 100 и низкая, либо неопределяемая вирусная нагрузка на протяжении более чем 3 месяцев, возможно рассмотрение отмены

антимикотической терапии. При уровне CD⁴⁺-клеток < 100 необходимо обсудить продолжение лечения противогрибковыми препаратами.

Хотя основной режим индукционной терапии является предпочтительным для лечения тяжелых форм менигоэнцефалита, доступность 5-FC нередко ограничена в регионах, где бремя криптококковой инфекции и смертность от нее наиболее высоки.

В ходе исследования альтернативных вариантов комбинаций антимикотиков было выяснено, что наиболее эффективным среди прочих является сочетание AmBd с флуконазолом (800 мг/сут). Совместное назначение данных препаратов приводит к ускорению стерилизации СМЖ, более скорому обратному развитию неврологической симптоматики и снижению смертности, в сравнении со схемами, задействующими только AmBd или флуконазол. [68]

Другие альтернативные схемы описаны в гайдлайнах, однако их назначение не рекомендуется ввиду весьма ограниченного количества данных об опыте применения.

Монотерапия флуконазолом в старте лечения также не рекомендована по причине того, что названный препарат имеет преимущественно фунгистатический эффект, следствием чего является более высокая частота рецидивов и значительный процент резистентных штаммов, высевающихся у пациентов с рецидивной и рецидивирующей инфекциями. Тем не менее в регионах без доступа к AmBd высокие дозы флуконазола (\geq 1200 мг/сут) до сих пор используют в старте терапии.

Трехэтапный режим, включающий индукцию, консолидацию и поддерживающую терапию является стандартом лечения криптококкового менингита для всех групп пациентов. У ВИЧ-инфицированных пациентов для индукционной терапии используют основной режим с дальнейшим переходом на 8-недельный курс флуконазола с суточной дозой 400-800 мг в качестве консолидирующей терапии. [69]

По окончании консолидации начинают длительный цикл поддерживающей терапии флуконазолом (являющейся, по сути, вторичной профилактикой) в дозировке 200-400 мг/сут. Такой подход позволил значительно снизить частоту рецидивов заболевания у пациентов с тяжелой иммуносупрессией: с приблизительно 40% до менее чем 5%. [70]

Поддерживающую терапию завершают в среднем спустя 1-2 года у пациентов с положительным ответом на АРВТ при условии достижения двух целей: увеличения числа CD4⁺-клеток до значений, превышающих 100 в 1 мл и неопределяемой вирусной нагрузки в течение не менее чем 3-х месяцев. [71]

Другие препараты группы азолов (итраконазол, вориконазол, позаконазол) активны в отношении изолятов криптококков *in vitro* и в комбинации с AmBd могут обладать фунгицидной активностью, схожей с 5-FC, однако вследствие различий в биодоступности, умеренной способности диффундировать через ГЭБ, высокой цены и в целом недостаточном опыте применения данных препаратов в отношении пациентов с криптококковым менингоэнцефалитом данные препараты не могут быть рекомендованы в качестве первой линии консолидирующей или поддерживающей терапии. Тем не менее, они могут быть использованы в случае рефрактерных к флуконазолу возбудителей. [72]

б) Сроки начала антиретровирусной терапии

У пациентов с ВИЧ-ассоциированной криптококковой инфекцией АРВТ вносит значительный вклад в долгосрочный прогноз заболевания. В нескольких исследованиях были высказаны предположения о повышенном риске развития воспалительного синдрома восстановления иммунной системы среди ВИЧ-инфицированных пациентов, начавших АРВТ в течение 1-2 недель после подтверждения диагноза оппортунистической инфекции. [73]

В работе Cryptococcal Optimal ART Timing Trial (COAT) было предложено руководство, постулирующее необходимость отсрочки начала АРВТ у пациентов с криптококковым менингитом минимум на 4 недели с момента

начала противогрибковой терапии. Это рандомизированное исследование продемонстрировало повышение показателя выживаемости у пациентов с криптококковым менингитом в том случае, если начало АРВТ было отложено на срок до 5-ти недель после постановки диагноза, в сравнении с группой, где терапия была начата в течение 2-х недель. Хотя увеличение частоты манифестного ВСВИ, наблюдаемого в группе пациентов с ранним началом АРВТ, не достигло статистически значимых значений, маркеры активации макрофагов были повышены, что позволяет предположить наличие субклинического ВСВИ, который оказывает влияние на показатель смертности. [74]

с) Выбор формы амфотерицина В для фазы индукции

К настоящему моменту на рынке доступны три варианта препаратов амфотерицина В. Исторически первым является амфотерицин В дезоксихолат (ABD), впервые зарегистрированный в США под торговым названием Fungizone. С течением времени ассортимент был пополнен липид-ассоциированными формами: амфотерицин В липидным комплексом (ABLC; Abelcet) и липосомальным амфотерицином В (LAMB; AmBisome). Активное вещество получают на биотехнологических производствах, культивируя *Streptomyces nodosus*. [75]

При внутривенном введении коллоидного раствора AmBd дезоксихолат-ион диссоциирует от молекулы действующего вещества, которая более чем на 95% связывается сывороточными белками, главным образом фракцией β -липопротеинов. Препарат плохо проникает в спинномозговую жидкость (независимо от того, воспалены ли мозговые оболочки), бронхиальный секрет, слюну, поджелудочную железу, мышцы, кости, водянистую влагу и нормальную амниотическую жидкость. [76]

Амфотерицин В дезоксихолат вызывает дозозависимое снижение скорости клубочковой фильтрации. Прямое сосудосуживающее действие на

афферентные почечные артериолы приводит к редукции клубочкового и канальцевого кровотока. Вторичные почечные эффекты включают увеличение экскреции ионов калия, магния, бикарбонатов, а также снижение продукции эритропоэтина. Стойкое снижение почечной функции имеет корреляцию с общей дозой использованного препарата, ее морфологическим субстратом являются лизис клеток почечных канальцев и нарушение целостности базальной мембраны канальцевого эпителия, это в конечном итоге приводит к снижению числа функционирующих нефронов. В связи с увеличением экскреции калия необходимо мониторировать его сывороточные концентрации и по необходимости возмещать потери путем перорального или парентерального введения. [77]

Особенности фармакокинетики амфотерицина В, осложняющие его использование в терапии нейроинфекций, а также высокая частота развития побочных эффектов привели к необходимости получения альтернативных форм препарата, отвечающих, по меньшей мере, двум требованиям: высокая проникающая способность через гематоэнцефалический барьер и меньшая, по сравнению с AmBd, нефротоксичность. Такой альтернативой выступили липид-ассоциированные формы амфотерицина В (Lipid-Associated Formulations of Amphotericin B – LFABs).

Амфотерицин В липидный комплекс (ABLC – Amphotec) представляет собой соединение молекулы препарата с липидами, которые повышают объем распределения вещества и его способность к диффузии через гистогематические барьеры. Другой представитель группы, липосомальный амфотерицин В (L-AMB – AmBisome), в водных растворах образует бислойные мембраны, замыкающиеся в пузырьки – липосомы. Молекулы активного вещества проникают непосредственно в структуру бислоя и в таком виде распределяются в органы и ткани. [78]

Средний диаметр липосом в суспензии L-AMB составляет 55-75 нм, на 1 молекулу амфотерицина В приходится порядка 9 молекул липидов. Липидный

компонент представлен смесью гидрогенизированного соевого лецитина, холестерина и натриевой соли дистеароилфосфатидилглицерола в соотношении 10:5:4. В отличие от других LFABs, при использовании равных доз сывороточные концентрации препарата не ниже, чем в случае AmBd. Тем не менее большая часть молекул препарата после внутривенного введения продолжает оставаться связанной с липидами бислоя, поэтому концентрации *свободного* амфотерицина В для дезоксихолата все же выше. [79]

Результаты рандомизированных клинических испытаний, сравнивающих схемы терапии с использованием AmBd и L-AMB, к настоящему моменту ограничиваются демонстрацией равной эффективности дезоксихолата и липосомальной формы в терапии криптококкового менингита и лучшими результатами L-AMB в лечении гистоплазмоза. Хотя липид-ассоциированные формы значительно превосходят амфотерицина В дезоксихолат по стоимости (в 10-60 раз), необходимо принимать во внимание достоверно меньшую частоту побочных эффектов при использовании LFABs, а также значительные затраты на выявление, мониторинг и лечение состояний, связанных с нефротоксичностью AmBd. [80] Важно отметить, что умеренная степень выраженности побочных эффектов липид-ассоциированных форм у лиц без тяжелой сопутствующей патологии и детей позволяет получать терапию даже амбулаторно. Преимущества LFABs, связанные с продленным периодом поддержания в крови терапевтических концентраций препарата, стали объектом исследований в работах по введению таких форм от одного до трех раз в неделю в качестве профилактики развития микозов у пациентов с лейкопенией. [81]

Ограниченное число работ, посвященных сравнительной характеристике эффективности и нефротоксичности AmBd и L-AMB, к настоящему моменту не позволяет сформировать целостное представление о принципах выбора препарата для фазы индукции. Противоречивые данные о скорости санации ликвора, регрессе клинических проявлений криптококкового поражения ЦНС,

смертности на фоне различных вариантов лечения создают определенные сложности при определении показаний к назначению липид-ассоциированных форм. Кроме того, большинство работ оценивает лишь абсолютный прирост креатинина на фоне терапии амфотерицином В, не принимая во внимание исходные значения данного показателя. Более актуальной представляется оценка динамики увеличения креатинина, более точно описывающая разницу в скорости патоморфологических изменений почечной паренхимы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая работа выполнена на основе ретроспективного анализа 75 историй болезни пациентов, получавших лечение в СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина», с диагнозом «В45.1 Церебральный криптококкоз» в период с начала 2018 и до окончания 2019 года. Базой для исследования послужили 9, 20, 24 и 25 отделения стационара. Возраст пациентов варьировал в пределах от 26 до 64 лет, его среднее значение составило $42,1 \pm 8,8$ года.

Пациенты были разделены на две группы: в первую вошли больные, получавшие в фазе индукции амфотерицина В дезоксихолат в дозе 1,0 мг/кг/день (торговое название – Амфотерицин В, производитель – Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез», Россия), во вторую – получавшие амфотерицин В липосомальный дозой 3,0 мг/кг/день (торговое название – Амбизом, производитель – Гилеад Сайенсиз Инк., США/Gilead Sciences Inc., USA).

Критерием включения в группу являлись:

1. Установленный диагноз «В20.5 Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлениями других микозов», подтвержденный лабораторными методами: наличие двукратного положительного результата ИФА на антитела к ВИЧ, положительные результаты анализа на антиген вируса р24 и иммуноблота.
2. Установленный диагноз «В45.1 Церебральный криптококкоз», подтвержденный результатами латекс-агглютинации, направленной на выявление АГ возбудителя в СМЖ, и культуральными методами.

Критериями исключения являлись:

1. Установленный диагноз другого инвазивного микоза, кроме «В59 Пневмоцистоз» (*P. jirovecii* обладает природной резистентностью ко всем компонентам схем терапии криптококкоза).

2. Уровень креатинина сыворотки крови, более чем в 2 раза превышающий верхнюю границу нормы.
3. Уровень АЛТ и АСТ сыворотки крови, более чем в 10 раз превышающий верхнюю границу нормы.
4. Анафилактические реакции на амфотерицин В в анамнезе.

Всем пациентам было проведено общеклиническое исследование, включавшее: физикальное обследование, клинический анализ крови, биохимический анализ крови, ИФА на антитела к ВИЧ, анализ на антиген вируса р24 и иммуноблоттинг (вестерн-блот) с целью подтверждения результатов ИФА, real-time ПЦР для определения вирусной нагрузки, методом проточной цитофлуометрии оценивался уровень CD4⁺-клеток; инструментальные исследования (рентгенография органов грудной клетки, ЭКГ), а также люмбальная пункция с последующим культуральным исследованием ликвора и серологическим исследованием на предмет наличия АГ *C. neoformans* (GXM).

Методы исследования

Физикальное обследование

Физикальное обследование включало в себя:

1. Расспрос на предмет жалоб;
2. Оценку неврологического статуса
 - 2.1. Общемозговая симптоматика:
 - головная боль;
 - тошнота и рвота;
 - 2.2. Менингеальная симптоматика:
 - ригидность затылочных мышц;
 - симптом Кернига;
 - симптомы Брудзинского.

Оценка клинического и биохимического анализов крови

Всем исследуемым пациентам проводился клинический анализ крови с определением уровня гемоглобина. В числе изучаемых биохимических

показателей у больных определялись уровни общего белка, креатинина и глюкозы. Исследования уровней концентрации креатинина и гемоглобина избраны для оценки нефротоксического и анемизирующего действия разных форм амфотерицина В. Анализ исходных показателей общего белка и глюкозы проводился для дополнительного контроля состояний, маркирующих скомпрометированную функцию почек: гипопроteinемии и сахарного диабета.

Подтверждение ВИЧ-инфекции и верификация ее стадии

Для обозначенной цели были произведены следующие исследования: ИФА на антитела к ВИЧ, анализ на антиген вируса р24, иммуоблоттинг (вестерн-блот) для подтверждения результатов ИФА (анализатор ProfiBlot 48), а также real-time ПЦР (анализатор LightCycler 96) с целью определения вирусной нагрузки. Для подсчета числа CD4⁺-клеток использовался метод проточной цитофлуометрии (анализатор CyFlow Space).

Анализ пунктата спинномозговой жидкости

Выявление лабораторных признаков церебрального криптококкоза осуществлялось путем анализа образца ликвора, полученного путем проведения люмбальной пункции. Производился посев материала на селективный агар Стейба с последующей культивацией в течение 48 часов при температуре 30°C. Для выявления капсулярного антигена *C. neoformans* (глюкуронилксиломаннана – GXM) использовалась полуколичественная тест-система Pastorex Crypto Plus, принцип работы которой основан на технологии латекс-агглютинации.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился на персональном компьютере с использованием программы SPSS v.23. Методы описательной статистики включали оценку среднего арифметического (M), средней ошибки среднего значения (m). Для сравнения исследуемых признаков в группах использовали критерий Стьюдента, χ -квадрат.

Для выявления наличия статистически значимой корреляции между количественными признаками использовался статистический метод с применением критерия Пирсона (r , в случае нормального распределения) и Спирмена (r_s , в случае ненормального распределения).

Графическая обработка данных проводилась при помощи программы Microsoft Office Excel 2010, базового набора пакетов языка программирования R и пакета ggplot2. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Сравнительная характеристика выявленных случаев

Сравнительная оценка групп, получавших AmBd и L-AMB, не выявляет достоверных различий в их половой структуре и основных клинико-лабораторных параметрах. Тем не менее, исследуемые группы были различимы по возрасту и исходному уровню креатинина (*таблица 4*).

Таблица 4. Сравнительная характеристика групп

	Группа, получавшая AmBd		Группа, получавшая L-AMB	
Пол	муж	жен	муж	жен
	58,5% (n=24)	41,5% (n=17)	58,8 % (n=20)	41,2% (n=14)
Средний возраст, лет (p=0,016)	39,61±8,95*		44,68±8,71*	
ИМТ, кг/м ² (p=0,284)	19,48±3,50		20,39±3,78	
Общемозговые симптомы (p=1)	97,6% (n=40)		97,1% (n=33)	
Менингеальные симптомы (p=0,682)	63,4% (n=26)		70,6% (n=24)	
Индекс Карновского (p=0,121)	49,51±16,27		43,24±18,38	
Гемоглобин до старта терапии, г/л (p=0,788)	130,05±24,65		128,56±22,72	
Креатинин до старта терапии, ммоль/л (p<0,01)	78,51±16,84*		96,41±17,06*	

Общий белок ($p=0,084$)	$69,36 \pm 9,58$	$73,29 \pm 9,81$
Глюкоза ($p=0,681$)	$5,98 \pm 1,42$	$6,11 \pm 1,33$

Примечание: * – $p < 0,05$

Таким образом, липосомальный амфотерицин В чаще назначался пациентам с более высокими исходными концентрациями сывороточного креатинина, которые были старше больных, получавших амфотерицина В дезоксихолат, в среднем на 5,07 лет.

Возрастная и половая структуры общей группы представлены на *рисунке 5*.

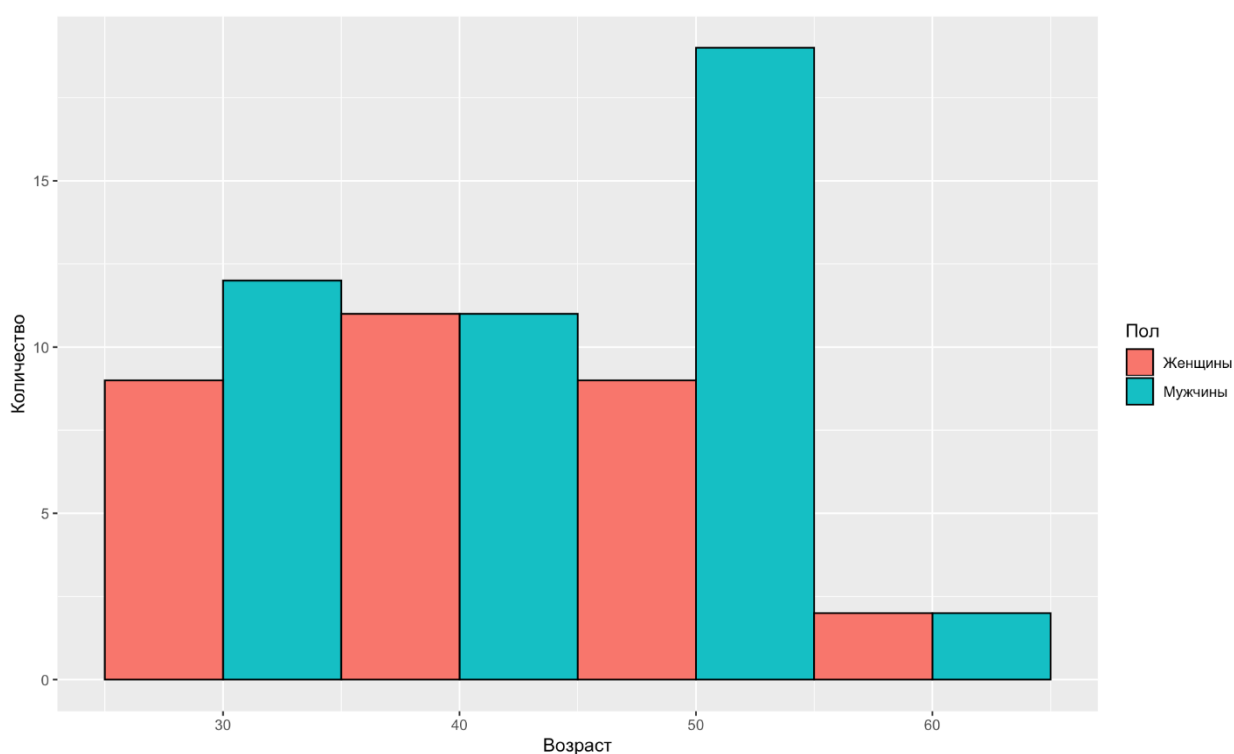


Рисунок 5. Возрастная и половая структуры общей группы

Преобладающая по численности подгруппа – мужчины в возрасте от 45 до 55 лет (17 человек). Достоверных различий в распределении возрастов в рамках общей группы не обнаруживается. Тем не менее, среди пациентов выявляется некоторое преобладание лиц мужского пола, которое согласуется с литературными данными. [82]

3.2. Стадирование ВИЧ-инфекции и коморбидные заболевания

Все пациенты исследуемых групп имели подтвержденный диагноз «B20.5 Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлениями других микозов», при этом ВИЧ-инфекция оценивалась по классификации В. И. Покровского, согласно в клиническим рекомендациям Министерства Здравоохранения Российской Федерации «ВИЧ-инфекция у взрослых» [87], и по системе, предложенной CDC. [88] Среди изучаемых лиц обеих групп у 84% пациентов (n=63) была установлена клиническая стадия 4В, соответствующая развернутому СПИД-ассоциированному комплексу и сопровождающаяся развитием генерализованных оппортунистических инфекций, в том числе церебрального криптококкоза. У 16% пациентов (n=12) состояние было расценено как стадия 5, терминальная. По классификации CDC у всех больных определена С3 стадия, характеризующаяся уровнем CD4⁺-клеток менее 200 в 1 мкл и наличием диагностированного СПИД-индикаторного состояния. На момент обследования никто из исследуемых лиц не получал АРВТ.

Среди пациентов исследуемых групп были диагностированы и другие оппортунистические инфекции и состояния, связанных с развитием вторичного иммунодефицита, вызванного ВИЧ-инфекцией. Информация о числе случаев различных нозологий и их частоте в сравниваемых группах представлена в *таблице 5*.

Таблица 5. Частота коморбидных заболеваний

Нозологическая единица	Группа, получавшая AmBd (n=41)	Группа, получавшая L-AMB (n=34)	Общее число больных (n=75)
Орофарингеальный кандидоз (p=1)	82,9% (n=34)	82,4% (n=28)	82,7% (n=62)

Кандидоз пищевода (p=0,321)	26,8% (n=11)	14,7% (n=5)	21,3% (n=16)
Пневмоцистоз (p=1)	17,1% (n=7)	14,7% (n=5)	16% (n=12)
ЦМВ-инфекция (p=0,512)	7,3% (n=3)	14,7% (n=5)	10,7% (n=8)
Туберкулез (p=0,598)	31,7% (n=13)	23,5% (n=8)	28% (n=21)
Микобактериозы (p=0,393)	22% (n=9)	11,8% (n=4)	17,3% (n=13)
ПМЛ (p=0,828)	4,9% (n=2)	8,8% (n=3)	6,7% (n=5)
Саркома Капоши (p=0,591)	12,2% (n=5)	5,9% (n=2)	9,3% (n=7)

Частота коморбидных заболеваний в обеих группах неразличима. Распределение пациентов по анализируемой патологии представлена на рисунке 6.

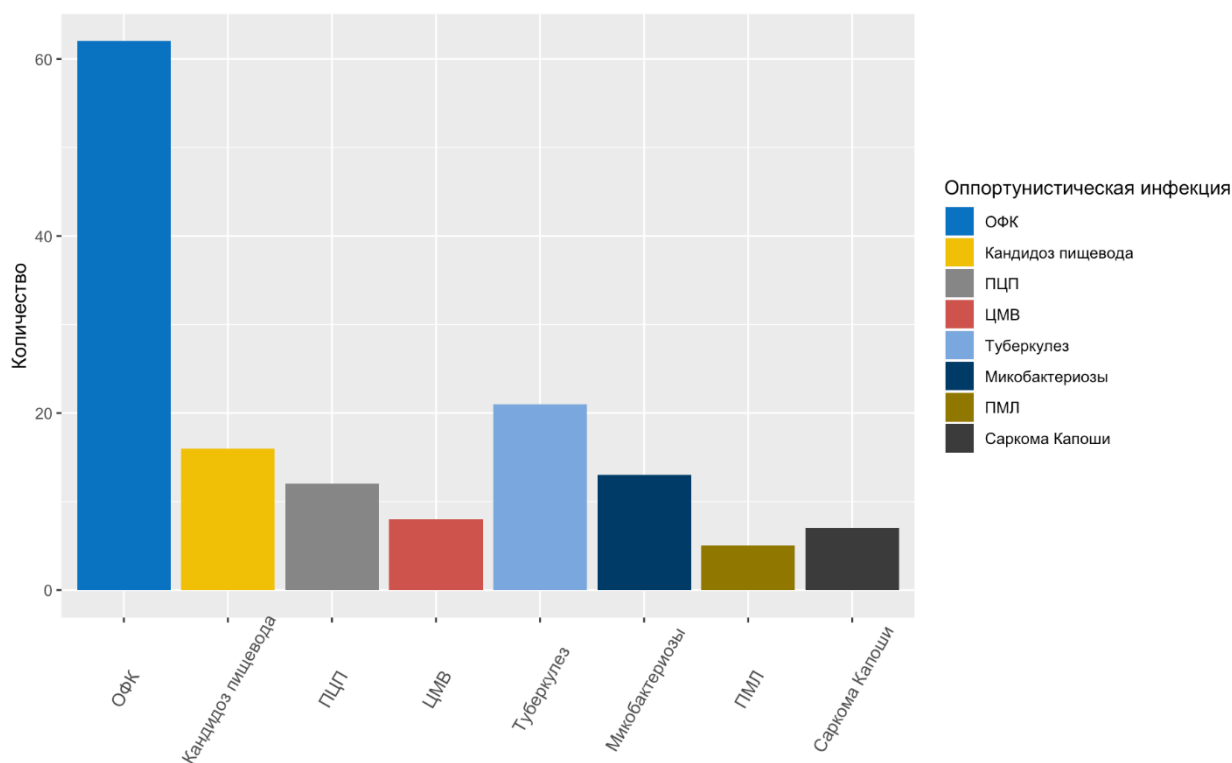


Рисунок 6. Распределение коморбидных оппортунистических инфекций и состояний, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией

Обнаруживается высокая частота поражения слизистых оболочек ротовой полости и глотки дрожжевыми грибами рода *Candida*, несколько реже выявлялись признаки вовлечения эпителия пищевода (82,7% (n=62) и 21,3% (n=16) соответственно). Столь существенные различия, однако, могут быть объяснены сложностями в диагностике кандидозного эзофагита, требующего проведения эндоскопического исследования. Несмотря на сравнительно высокую частоту такого рода патологии в анализируемых группах, общность звеньев патогенеза висцерального криптококкоза и поверхностных форм кандидоза относительна и связана лишь непосредственно с особенностями ВИЧ-индуцированного иммунодефицита.

Обращает на себя внимание высокая распространенность туберкулеза среди исследуемых лиц (28% (n=21)). К настоящему моменту ряд авторов рассматривает туберкулез в качестве независимого фактора риска развития криптококкоза. [83] Сходства иммунного ответа в отношении заболеваний,

вызываемых *M. tuberculosis* и *C. neoformans*, связаны с образованием гранулематозного вала в первичном легочном очаге. Несостоятельность процессов отграничения первичного инфекта, развивающаяся на фоне ВИЧ-инфекции, может быть рассмотрена в качестве фактора риска генерализации как для туберкулеза, так и для криптококкоза. Единичные работы, посвященные симультанному течению этих заболеваний, отмечают чрезвычайно высокую частоту диагностических ошибок, связанных со сходством рентгенологической картины обсуждаемых патологий. [84]

Несколько реже встречались пневмоцистоз, ЦМВ-инфекция, микобактериозы, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия и саркома Капоши.

3.3. Иммунологическая характеристика

В рамках настоящего исследования производилась оценка иммунологических показателей исследуемых больных, путем определения чисел CD4⁺ и CD8⁺-клеток с использованием метода проточной цитофлуометрии и расчет показателя иммунорегуляторного индекса, определяемого как соотношение CD4⁺/CD8⁺. Кроме того, всем пациентам производилось определение вирусной нагрузки, соответствующей числу копий возбудителя в 1 мл сыворотки, методом real-time ПЦР.

В *таблице 6* представлены абсолютные значения названных показателей в обеих изучаемых группах.

Таблица 6. Показатели иммунограммы и вирусная нагрузка

Показатель	Группа, получавшая AmBd	Группа, получавшая L-AMB
Число CD4 ⁺ -клеток в 1 мл (p=0,672)	56,15±24,89	53,53±28,36
Число CD8 ⁺ -клеток в 1 мл (p=0,386)	554,88±102,46	532,62±118,58
CD4 ⁺ / CD8 ⁺	0,10±0,05	0,11±0,07

(p=0,828)		
Вирусная нагрузка, число копий (p=0,674)	305390,24±303650,69	335294,12±308170,51

Приведенные показатели свидетельствуют о выраженном иммунодефиците, ставшем причиной развития генерализованной криптококковой инфекции.

Рисунок 7 иллюстрируют вероятностное распределение чисел CD4⁺-клеток.

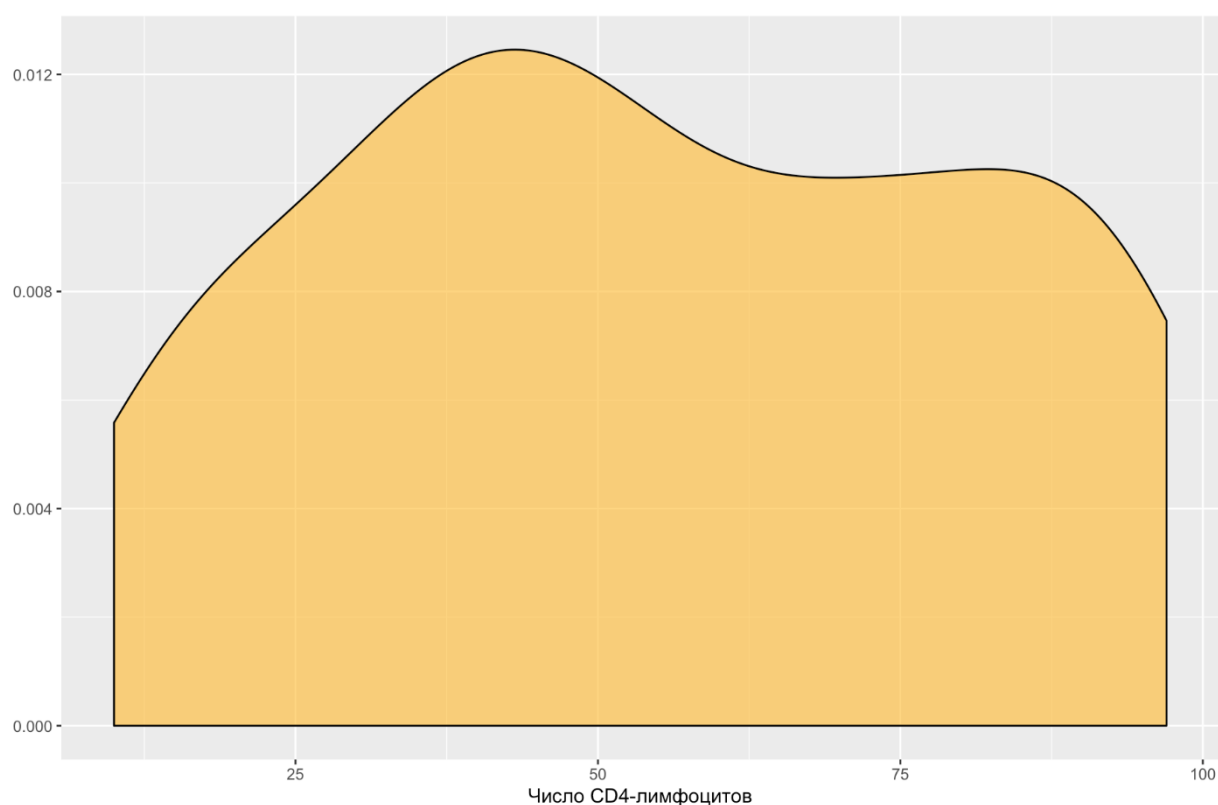


Рисунок 7. Вероятностное распределение чисел CD4⁺-клеток

Абсолютные значения уровня CD4⁺-клеток колебались в пределах от 10 до 97 в 1 мкл, показатель иммунорегуляторного индекса — от 0,02 до 0,29.

На рисунке 8 представлено вероятностное распределение показателей вирусной нагрузки пациентов.

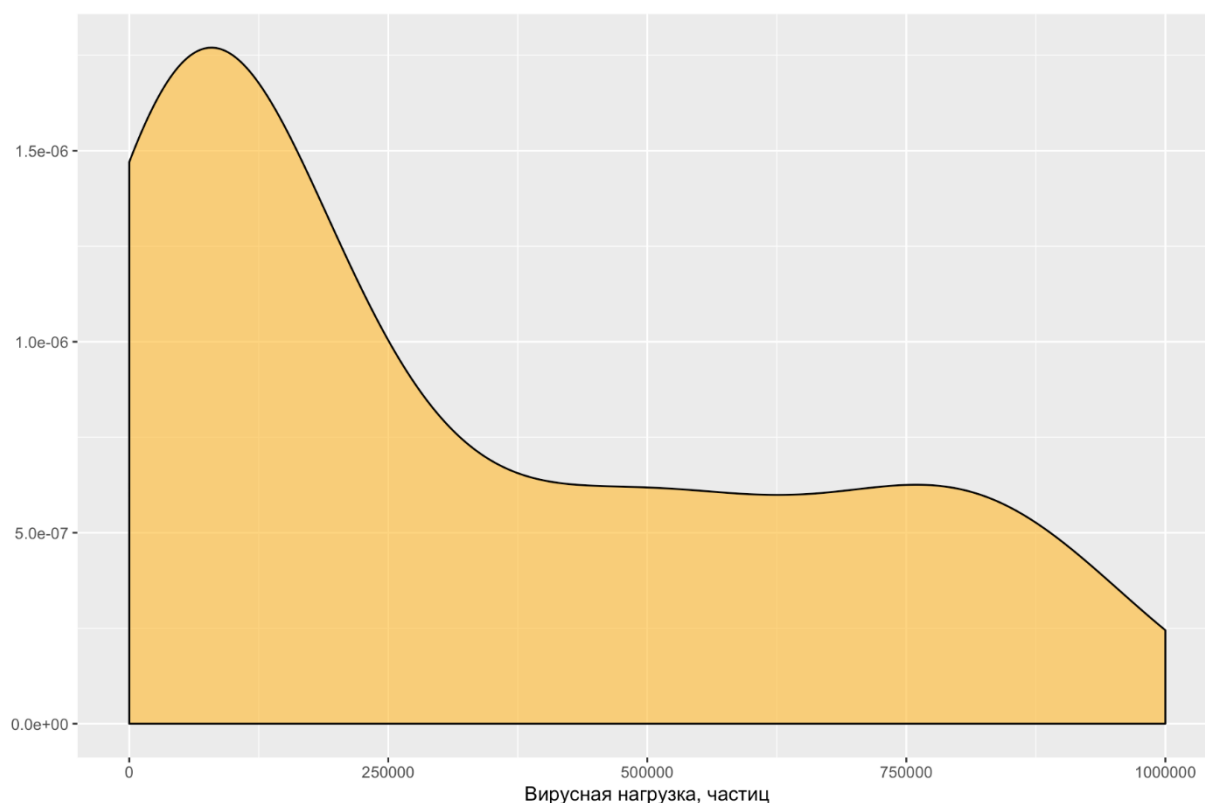


Рисунок 8. Вероятностное распределение показателей вирусной нагрузки

Минимальный определенный уровень вирусной нагрузки в исследуемой выборке установился на значении 13000 копий, максимальный составил 960000.

Таким образом, в рамках поставленной цели настоящей работы можно сделать вывод, что исследуемые группы лиц представлены больными ВИЧ-инфекцией 4В и 5 стадий по классификации В. И. Покровского и С3 по CDC, имеющими ухудшение состояния без АРВТ. Среди коморбидных оппортунистических инфекций наиболее частыми выявляемыми нозологиями были ОФК и туберкулез. Полученные данные являются закономерным следствием выраженного угнетения клеточного звена иммунитета больных и высоких показателей вирусной нагрузки.

3.4. Особенности неврологического статуса

Диагноз церебрального криптококкоза устанавливался на основании выявления клинических признаков поражения тканей головного мозга и его оболочек, данных ликворограммы, культурального и серологического исследований пунктата СМЖ. Для выявления особенностей неврологической симптоматики у пациентов с криптококковым поражением ЦНС был проведен анализ частотного распределения общемозговых (головная боль, тошнота и рвота) и менингеальных (ригидность затылочных мышц, симптомы Кернига, Брудзинского) симптомов. Полученные результаты приведены в *таблице 7*.

Таблица 7. Частоты выявляемых неврологических симптомов

Симптом	Группа, получавшая AmBd (n=41)	Группа, получавшая L-AMB (n=34)	Общее число больных (n=75)
Головная боль (p=1)	97,6% (n=40)	97,1% (n=33)	97,3% (n=73)
Тошнота и рвота (p=0,1)	87,8% (n=36)	100% (n=34)	93,3% (n=70)
Ригидность затыл. мышц (p=0,682)	63,4% (n=26)	70,6% (n=24)	66,7% (n=50)
Симптом Кернига (p=0,736)	46,3% (n=19)	52,9 (n=18)	49,3% (n=37)
Симптомы Брудзинского (p=0,221)	39% (n=16)	55,9% (n=19)	46,7% (n=35)

Группы неразличимы по исследуемым признакам, это позволяет сделать вывод о том, что особенности неврологического статуса не являлись критерием выбора формы препарата амфотерицина В. Рисунок 9 демонстрирует распределение выявленных неврологических симптомов. Согласно полученным данным, 33,3% (n=25) больных в исследуемых группах не обнаруживали специфических признаков поражения мозговых оболочек, в связи с чем диагноз церебрального криптококкоза был установлен после ликворологического и серологического исследований спинномозговой жидкости, это подчеркивает особую важность проведения люмбальной пункции у таких пациентов. Отсутствие достоверных клинических признаков обсеменения мозговых оболочек позволяет говорить о подостром варианте течения менингита, а в случае сохранения симптомов более 4 недель о хронизации процесса. Согласно литературным данным, *C. neoformans* является наиболее частым этиологическим агентом хронических форм менингита в западном полушарии. [85]

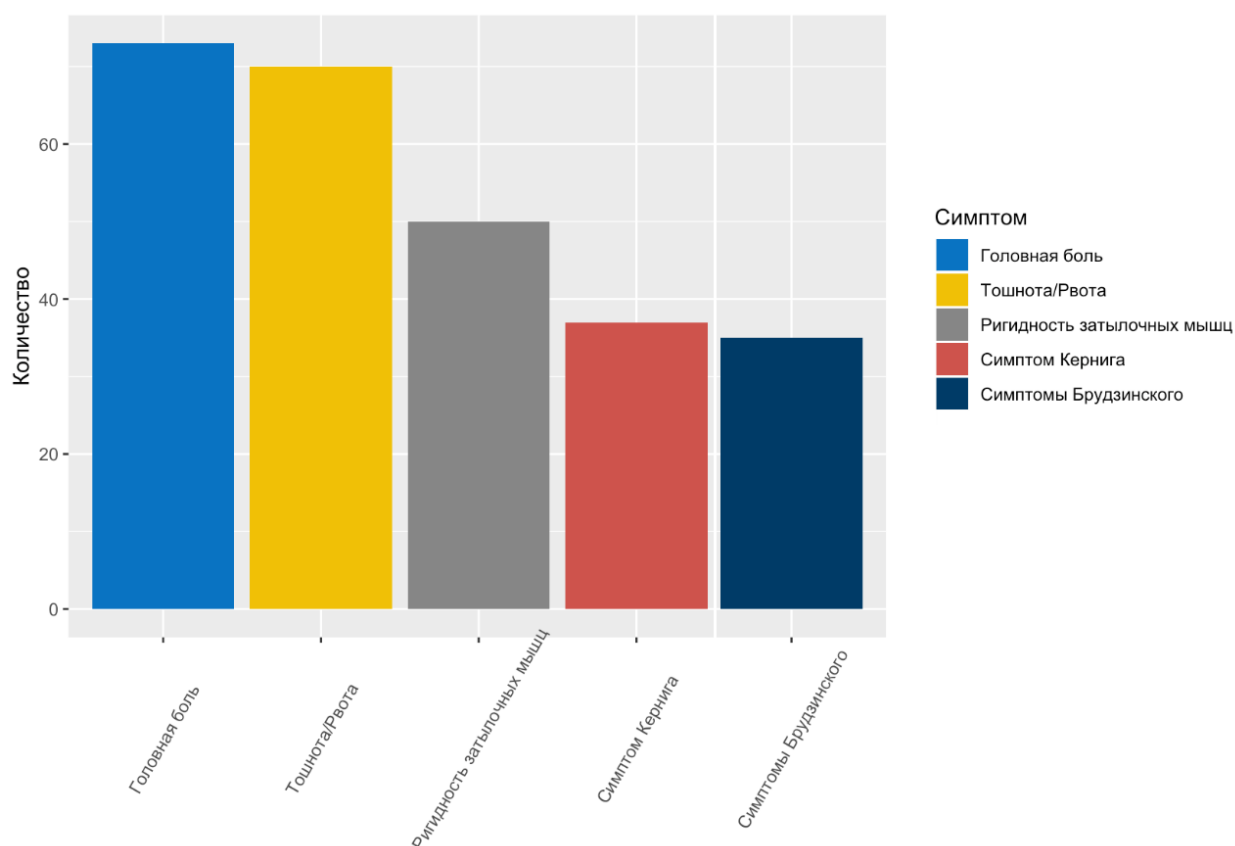


Рисунок 9. Частотное распределение неврологических симптомов

У 20% (n=15) больных были выявлены признаки угнетения сознания: 13,3% (n=10) соответствовали критерию сопорозного состояния и 6,7% (n=5) находились в состоянии комы. К основным причинам развития подобного рода осложнений относят прогрессивное нарастание ВЧД, следствием которого становится компрессия путей оттока ликвора в субарахноидальных пространствах и обструктивная гидроцефалия. [50]

3.5. Ликворологическая характеристика

Всем пациентам обеих исследуемых групп была проведена люмбальная пункция с дальнейшим ликворологическим исследованием полученного образца спинномозговой жидкости. В ходе проведения анализа оценивались концентрации белка и глюкозы, определялось общее число клеточных элементов, а также процентное содержание нейтрофилов и лимфоцитов. Полученные данные приведены в *таблице 8*.

Таблица 8. Ликворологическая характеристика образцов СМЖ до старта этиотропной терапии

Показатель	Группа, получавшая AmBd (n=41)	Группа, получавшая L-AMB (n=34)
Белок ликвора, г/л (p=0,021)	1,2±0,47*	0,94±0,5*
Глюкоза ликвора, ммоль/л (p=0,17)	1,15±0,29	1,25±0,33
Цитоз ликвора (p=0,864)	75,56±18,17	76,32±20,1
Нейтрофилы, % (p=0,802)	23,39±8,09	22,88±9,39
Лимфоциты, % (p=0,823)	73,78±8,32	74,24±9,23

Примечание: * – p<0,05

Результаты анализа демонстрируют, что группы пациентов являлись различимыми по уровню белка ликвора, тем не менее, отсутствие различий по другим исследуемым показателям не позволяет говорить о том, что данные ликворограммы могли служить критерием выбора формы лекарственного препарата.

Согласно приведенным результатам, у пациентов выявлялась гиперпротеинария в среднем до уровня 1,07 г/л. Среди основных причин данного состояния выделяют повышение проницаемости структур ГЭБ и снижение интенсивности процессов поглощения белковых молекул клетками паутинной мозговой оболочки. Также обнаруживались признаки гипогликорахии: среднее значение глюкозы ликвора установилось на уровне 1,2 ммоль/л, - такие показатели связаны со снижением интенсивности процессов активного транспорта через ГЭБ на фоне воспаления, увеличением гликолитической активности ЦНС и возросшим потреблением молекул дисахарида лейкоцитами и клетками возбудителя.

При исследовании клеточного состава ликвора выявлялся слабый плеоцитоз – в среднем до уровня 75,56 клеток в 1 мл. Имело место преобладание лимфоцитарного компонента.

В контексте обозначенной задачи можно заключить: треть (n=25) всех выявленных случаев криптококкового менингита не обнаруживала клинических признаков обсеменения мозговых оболочек, что позволяет говорить о подострой или хронической форме течения заболевания у таких пациентов. Кроме того, выявлялось преобладание частоты неспецифической общемозговой симптоматики над менингеальной, что согласуется с литературными данными. [44] Анализ результатов ликворологического исследования позволяет сделать вывод о промежуточном положении характеристик криптококкового менингита, которые имеют определенное сходство как с признаками гнойных форм (гиперпротеинария, гипогликорахия), так и с серозными вариантами поражения мозговых оболочек (лимфоцитарный плеоцитоз). [86] При этом умеренность

выявленных изменений определяет своеобразие картины ликворограммы и позволяет высказать предположение об этиологии заболевания до получения результатов серологических и культуральных исследований.

3.6. Сравнение эффективности AmBd и L-AMB

Для изучения антифунгального эффекта рассматриваемых препаратов была произведена ретроспективная оценка ряда клинических и лабораторных параметров. Во временной структуре схемы этиотропной терапии криптококкового менингоэнцефалита были определены моменты, в которых производилось сравнение чисел пациентов, достигших заданных конечных точек. Среди них были выделены следующие:

- основная конечная точка эффективности – микологический успех на 2-й неделе: конверсия культуральных данных по результатам посева ликвора на агар Стейба к моменту окончания индукционной фазы терапии;
- вторичные конечные точки:
 - микологический успех на 4-й неделе – через 2 недели после начала фазы консолидации, подразумевающей ежедневный прием 400 мг флуконазола (общая продолжительность фазы – 8 недель), это момент старта АРВТ;
 - клинический успех на 2-й неделе: отсутствие признаков прогрессирования или регресс неврологической симптоматики;
 - клинический успех на 4-й неделе: разрешение неврологической симптоматики, либо уменьшение степени ее выраженности;
 - терапевтический успех на 4-й неделе – определяется как совокупность критериев микологического и клинического успехов на 4-й неделе;
 - выживаемость на 4-й неделе.

Была произведена сравнительная оценка обеих групп по обозначенным показателям. Результаты проведенного анализа представлены в *таблице 9*.

Таблица 9. Сравнение чисел пациентов, достигших заданных конечных точек

Конечная точка	Группа, получавшая AmBd	Группа, получавшая L-AMB
Микологический успех на 2-й неделе (p=0,271)	46,3% (n=19)	61,8% (n=21)
Микологический успех на 4-й неделе (p=1)	70,7% (n=29)	70,6% (n=24)
Клинический успех на 2-й неделе (p=0,641)	65,9% (n=27)	73,5% (n=25)
Клинический успех на 4-й неделе (p=1)	75,6% (n=31)	76,5% (n=26)
Терапевтический успех на 4-й неделе (p=1)	70,7% (n=29)	70,6% (n=24)
Выживаемость на 4-й неделе (p=0,529)	80,5% (n=33)	88,2% (n=30)

Изучение результатов, полученных в основной конечной точке эффективности, позволяет говорить о том, что санация ликвора к моменту окончания фазы индукции произошла у 53,3% (n=40) больных. Несмотря на некоторое преобладание числа пациентов, соответствующих критериям конверсии культуральных данных, в группе L-AMB, статистически значимых различий между препаратами выявлено не было.

По прошествии двух недель фазы консолидации доля пациентов, достигших микологического успеха, возросла до 70,6% (n=53), при этом обнаруженные в

разных группах результаты также оказались неразличимы. Графическая интерпретация полученных данных представлена на *рисунке 10*.

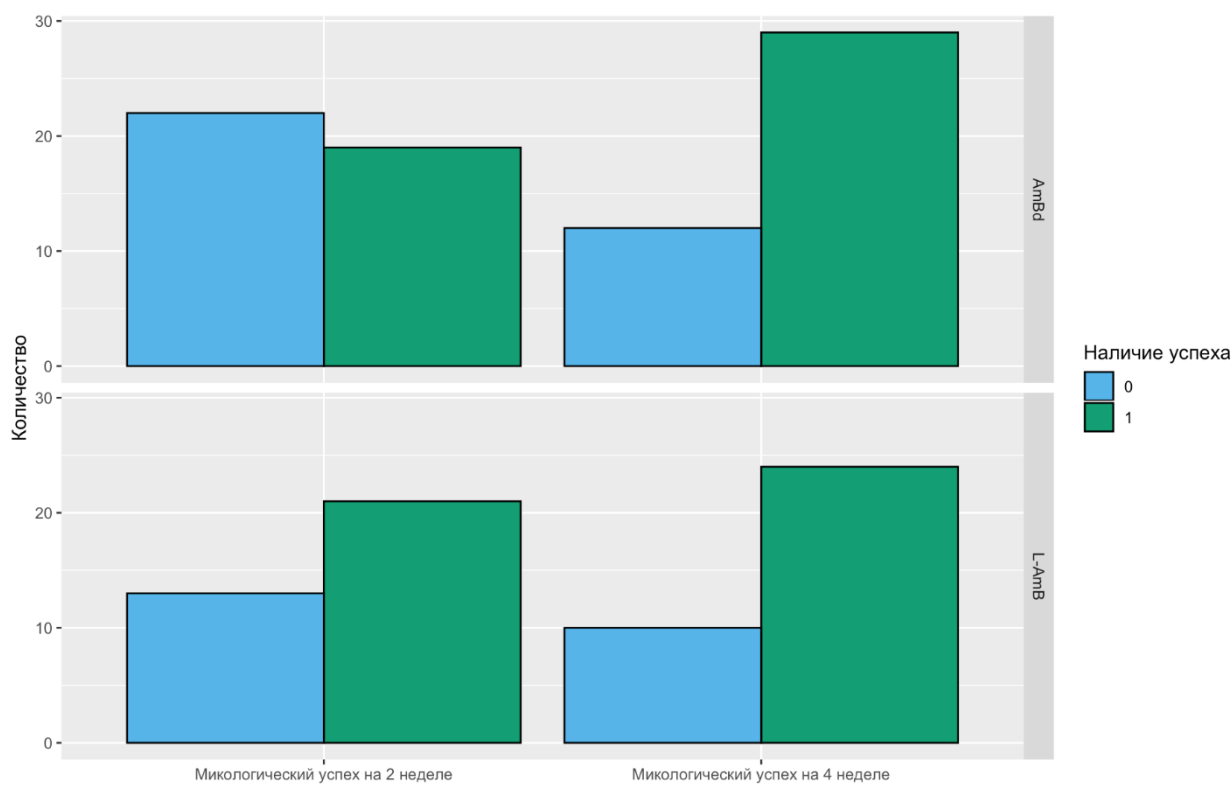


Рисунок 10. Сравнение чисел пациентов, достигших микологического успеха ко 2-й и 4-й неделям

Клинический ответ на проводимую терапию к исходу 2 недели имел место у 63,3% (n=52) пациентов, при этом у 16% (n=12) сохранялись признаки поражения мозговых оболочек по данным посева. На момент окончания 4-й недели полное разрешение или частичный регресс симптоматики выявлялся у 76% (n=57) больных, среди них 5,3% (n=4) так и не прошли точку конверсии культуральных данных. Результаты, полученные при сравнении показателей в обеих группах, снова были неразличимыми. *Рисунок 11* иллюстрирует приведенные в тексте факты. Значения, определяемые в точке терапевтического успеха на 4-й неделе, неотличимы от таковых в точке микологического успеха на 4-й неделе.

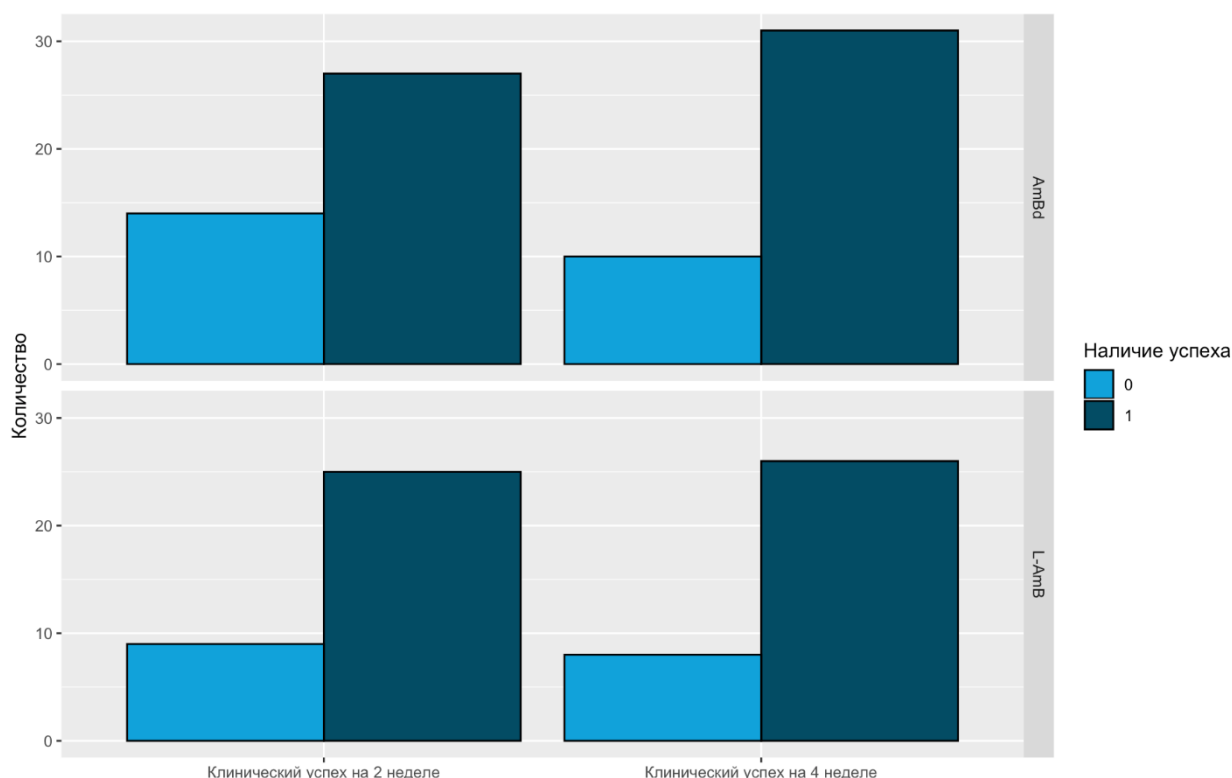


Рисунок 11. Сравнение чисел пациентов, достигших клинического успеха ко 2-й и 4-й неделям

Среди общего числа пациентов настоящей выборки 16% (n=12) скончались к концу 4-й недели. Выявляется некоторое преобладание показателя выживаемости в группе больных, получавших L-AMB, которое, однако, не является статистически достоверным. Ни один из погибших не соответствовал критериям микологического и клинического успехов на 2-й и 4-й неделе. Состояние каждого из них было расценено как терминальное, выставлена 5 стадия ВИЧ-инфекции по классификации Покровского. У всех погибших пациентов в качестве непосредственной причины смерти был обозначен острый отек-набухание головного мозга, ставший следствием прогрессирующей гидроцефалии. На *рисунке 12* приведены диаграммы, сравнивающие выживаемость в исследуемых группах.

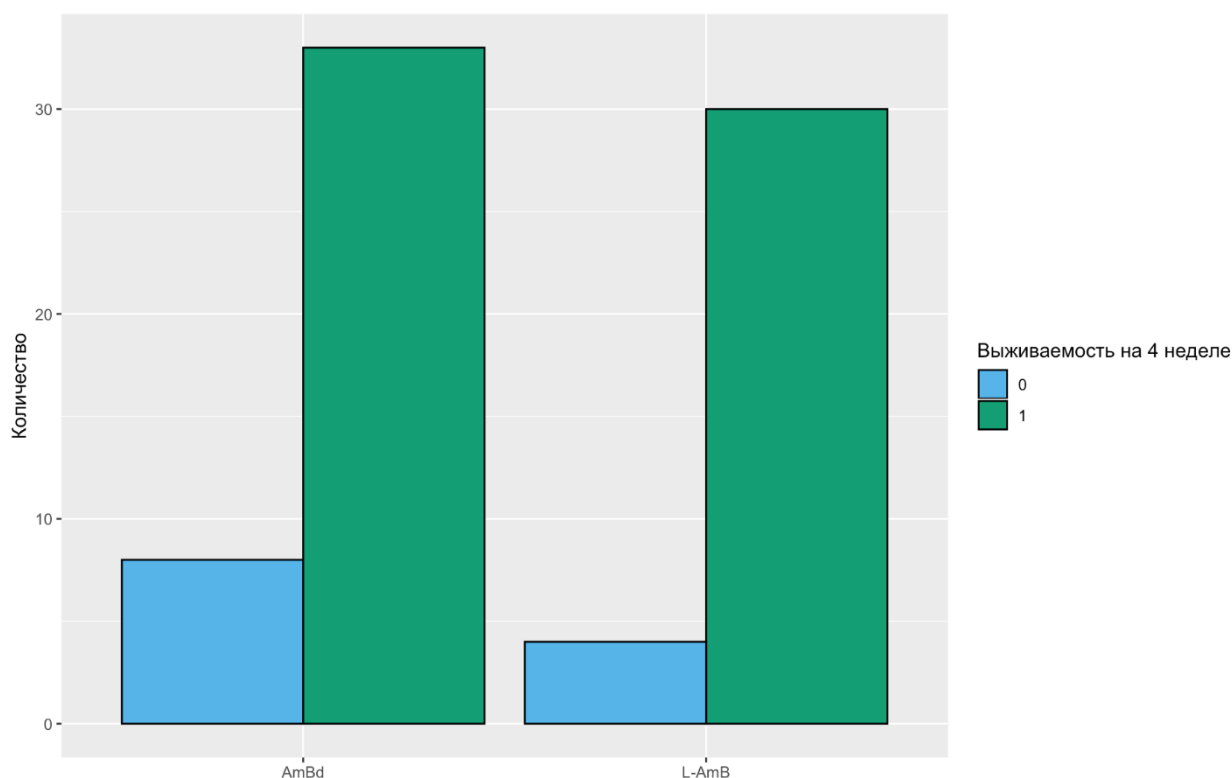


Рисунок 12. Сравнение чисел пациентов, скончавшихся к исходу 4 недели

Значения выявленных показателей вновь оказались неразличимы, что можно расценить как закономерное следствие приведенных в предыдущих частях раздела результатов.

Подводя итоги проведенного исследования, можно говорить о том, что полученные данные согласуются с литературными: проспективные исследования, сравнивающие эффективность препаратов в заданных дозах - 1,0 мг/кг/день для AmBd и 3,0 мг/кг/день для L-AMB – не выявляли статистически достоверных различий для двух схем терапии. Описанные в работах ряда авторов особенности фармакокинетики L-AMB, предполагающие более высокую проникающую способность препарата через структуры ГЭБ, не имеют реального клинического приложения в стандартных схемах терапии криптококкового менигоэнцефалита. [89]

К настоящему моменту появляются исследования, сравнивающие клиническую эффективность регламентированных доз амфотерицина В дезоксихолата с двойными терапевтическими дозами липосомального

амфотерицина В, составляющими 6,0 мг/кг/день. Последние позволяют добиться скорейшей санации ликвора у больных церебральным криптококкозом и большей, в сравнении с конвенциональной формой препарата, выживаемости. К сожалению, высокая стоимость такого лечения ограничивает его применение в экономически развивающихся странах, где бремя криптококковой инфекции к настоящему моменту оказывается наибольшим. [90]

3.7. Сравнение токсичности AmBd и L-AMB

Для оценки влияния различных форм амфотерицина В на функциональное состояние клубочкового аппарата и выделение эритропоэтина производилась оценка уровней сывороточного креатинина и гемоглобина в трех точках: до старта этиотропной терапии, в середине фазы индукции – на 7-ые сутки – когда была введена половина от предполагаемой общей дозы препарата и в момент перехода к фазе консолидации – на 14-ые сутки.

Ввиду имеющихся различий в исходных уровнях исследуемых показателей, оценка их динамики производилась методами ковариационного анализа, позволяющего проследить значимость взаимодействия ковариаты и зависимой переменной.

Под ковариатой подразумевают независимую количественную переменную, в качестве которой в данной работе выступали показатели концентраций креатинина и гемоглобина до начала лечения. Зависимая переменная представляет собой величину, определяемую значением ковариаты, а также наличием и характером проводимого лечения (AmBd или L-AMB), которое выступало в качестве группирующего фактора. В качестве зависимых переменных были избраны уровни креатинина и гемоглобина через 1 и 2 недели после начала терапии.

Средние показатели исходного уровня креатинина в группах, получавших AmBd и L-AMB, составляли $78,51 \pm 16,84$ ммоль/л и $96,41 \pm 17,06$ ммоль/л

соответственно, и были достоверно различимы ($p < 0,01$). Частотное распределение по обсуждаемому параметру приведено на *рисунке 13*.

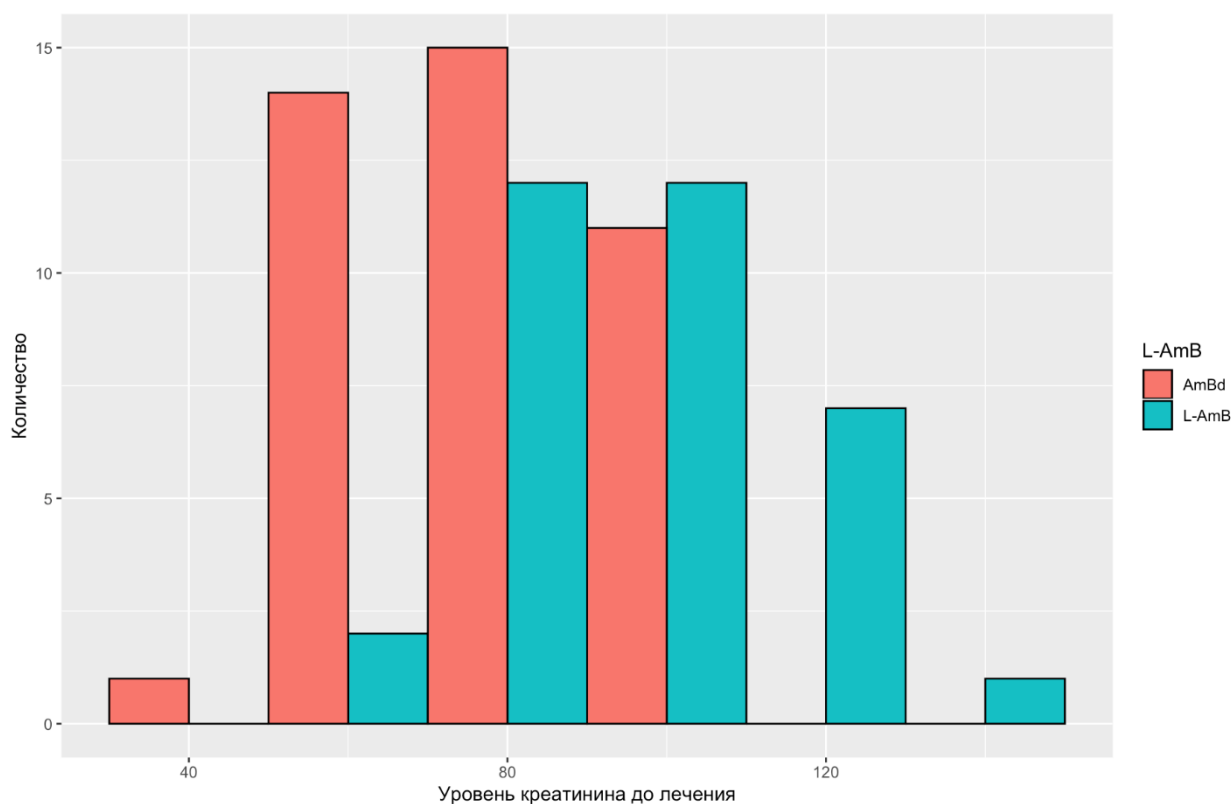


Рисунок 13. Частотное распределение уровней креатинина до старта терапии

Среди пациентов-мужчин превышение верхней границы нормы, составляющей 106 ммоль/л, исходно выявлялось у 31,8% ($n=14$), среди женщин – у 22,6% ($n=7$), при норме до 80 ммоль/л.

По истечении 7 суток фазы индукции значения показателей составили $107,54 \pm 23,85$ ммоль/л в группе AmBd и $111,53 \pm 20,75$ ммоль/л в группе L-АМВ. При этом по результатам количественного анализа группы оказались неразличимы: r -критерий составил 0,447. Тем не менее, при проведении исследования динамики прироста величин методами ковариационного анализа, являющегося качественным, были выявлены статистически достоверные различия ($p < 2e-16$). Графическое отображение полученных результатов представлено на *рисунке 14*.

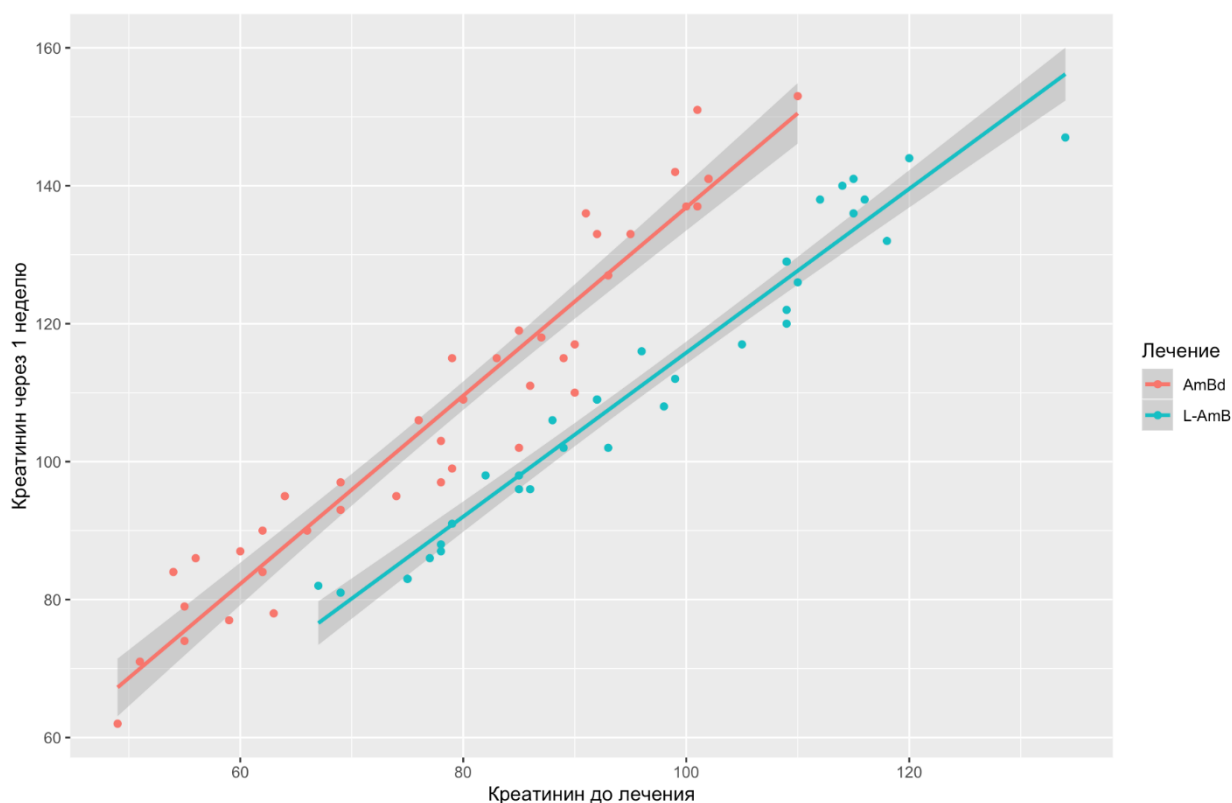


Рисунок 14. Зависимость конечного уровня креатинина от исходного через 1 неделю терапии в двух группах

Приводимые данные свидетельствуют о значимом взаимодействии ковариаты и группирующего фактора для показателей креатинина через 1 неделю.

В обозначенной временной точке выявлялся прирост уровня исследуемой величины в среднем на 37% у пациентов, получавших терапию конвенциональной формой препарата, и на 15,7% у больных, получавших липосомальный амфотерицин В.

К моменту окончания фазы индукции определялись следующие значения мониторируемого показателя: $136,56 \pm 29,78$ ммоль/л в группе AmBd и $131,03 \pm 24,31$ ммоль/л в группе L-AMB. Статистически достоверные различия методами количественного анализа не выявляются ($p=0,388$). Проведение ковариационного анализа обнаруживает такие различия, причем их глубина выражена в еще большей степени, чем в предыдущей точке ($p < 2e-16$). Также имеют место признаки значимой корреляции между конечным уровнем креатинина, вариантом используемого препарата и исходным значением

параметра. Графическая интерпретация полученных результатов приведена на *рисунке 15*.

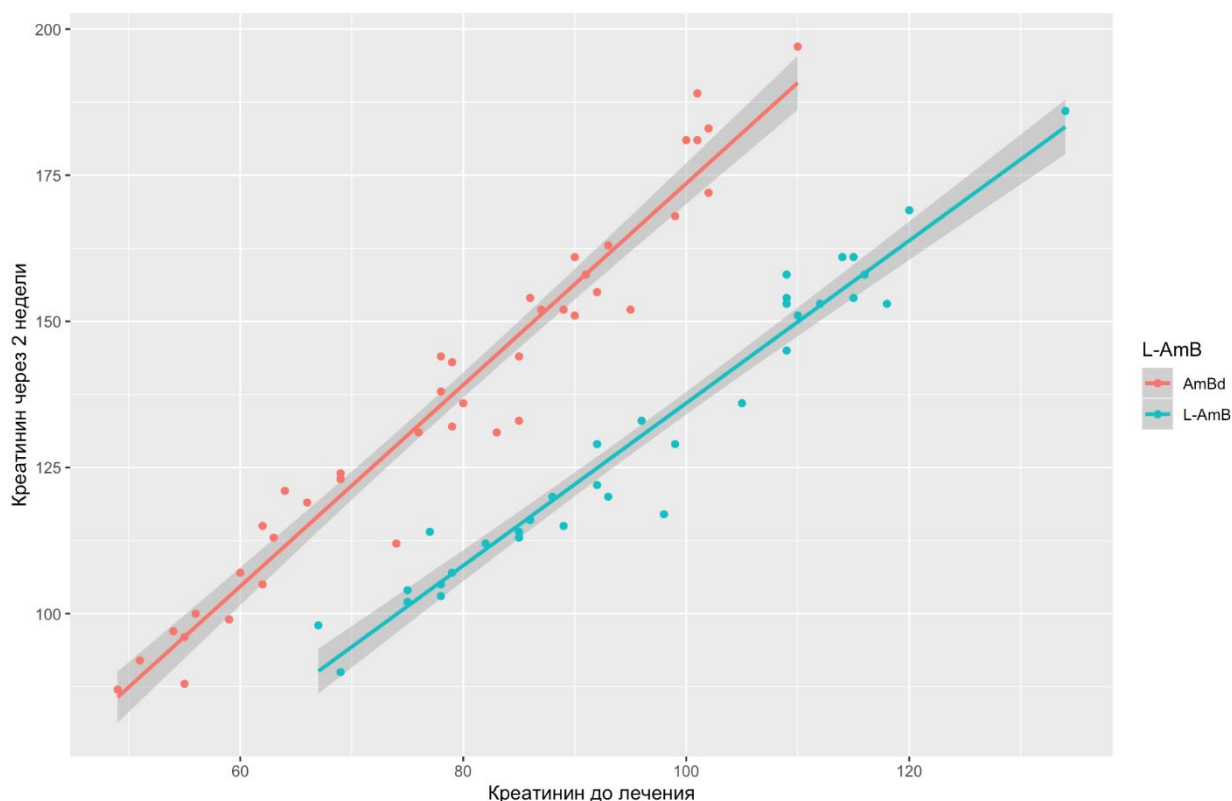


Рисунок 15. Зависимость конечного уровня креатинина от исходного через 2 недели терапии в двух группах

За 2 неделю прирост средних значений уровня креатинина в группе AmBd составил - 27%, в группе L-AMB – 17,5%.

До старта этиотропной терапии средние значения уровня гемоглобина среди лиц, получавших амфотерицина В дезоксихолат составляли $130,05 \pm 24,65$ г/л, у больных, лечение которых осуществлялось липосомальной формой препарата – $128,56 \pm 22,72$ г/л. По исследуемому показателю группы оказались неразличимы: $p=0,788$. Частотное распределение пациентов по концентрации гемоглобина приведено на *рисунке 16*.

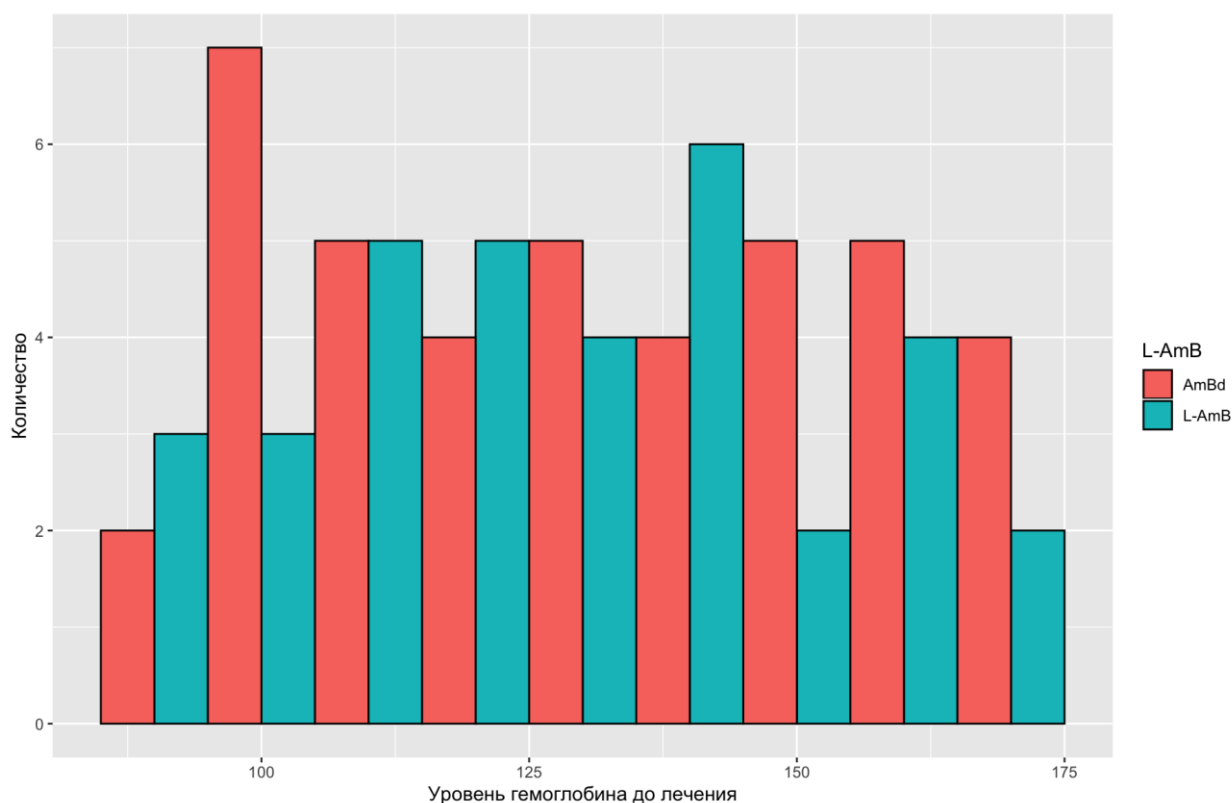


Рисунок 16. Частотное распределение пациентов по уровню гемоглобина

У 63,6% (n=28) мужчин и 29% (n=9) женщин выявлялись лабораторные признаки анемии легкой степени тяжести.

Спустя 1 неделю терапии в группе больных, получавших AmBd, средние концентрации гемоглобина составили $118,93 \pm 22,37$ г/л, в группе L-AMB – $122,68 \pm 21,43$ г/л. Признаков статистически достоверных различий по данным количественного исследования не выявлено: $p=0,464$. Результаты ковариантного анализа, напротив, различия обнаруживают, однако степень их выраженности несколько ниже, чем в случае креатинина ($p=6e-08$). Рисунок 16 иллюстрирует полученные результаты.

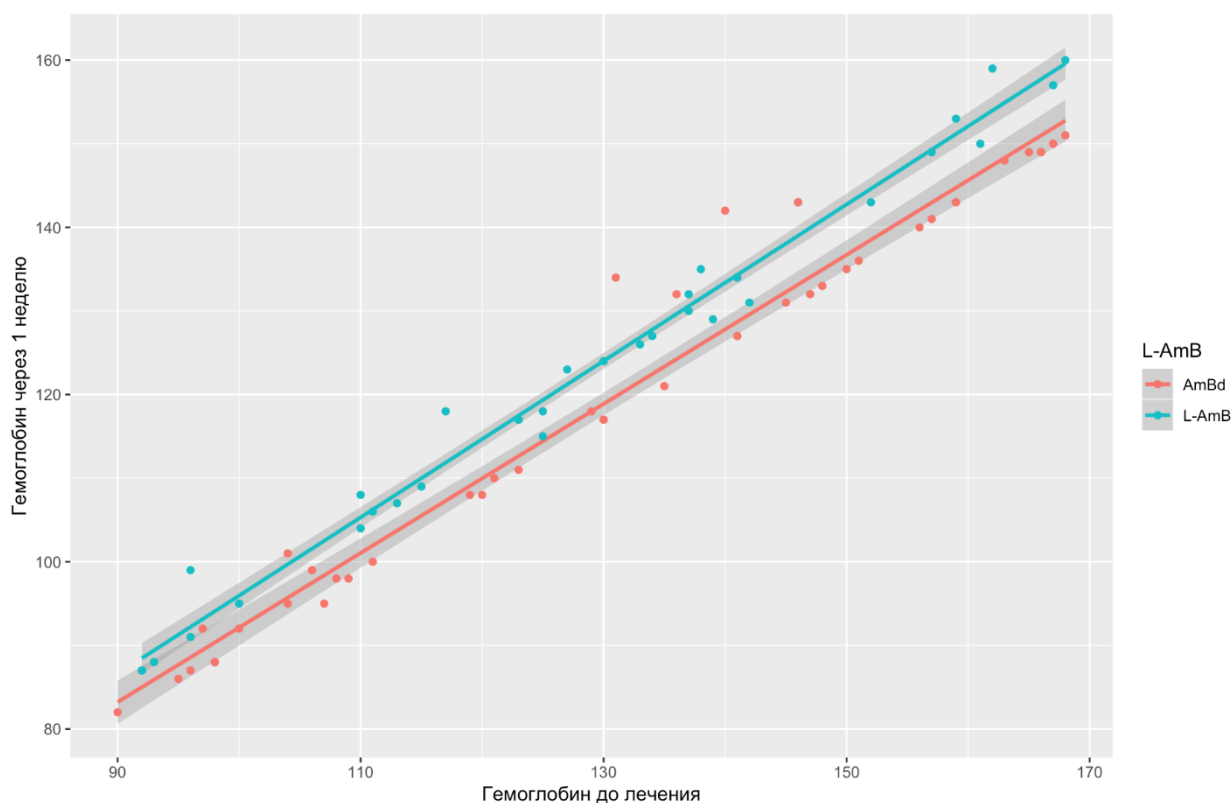


Рисунок 16. Зависимость конечного уровня гемоглобина от исходного через 1 неделю терапии в двух группах

Имеют место признаки значимой корреляции между конечным уровнем гемоглобина, вариантом используемого препарата и исходным значением параметра. К исходу 1 недели фазы индукции среди пациентов, получавших терапию AmBd, выявлялось снижение средних значений исследуемого параметра на 8,6%, в группе L-AMВ – на 4,6%.

На момент окончания фазы индукции показатели гемоглобина составляли $110,71 \pm 21,31$ г/л для больных на терапии конвенциональным амфотерицином В и $112,71 \pm 26,81$ г/л среди лиц, получавших липосомальную форму препарата. По результатам количественного анализа группы неразличимы: р-критерий составил 0,72. Проведение ковариантного анализа также не выявляет достоверных различий: обнаруживается корреляция конечного уровня гемоглобина с исходным, но признаки значимого взаимодействия с группирующим фактором (вариантом лечения) отсутствуют – $p=0,317$.

Графическое отображение приводимых результатов представлено на *рисунке 17*.

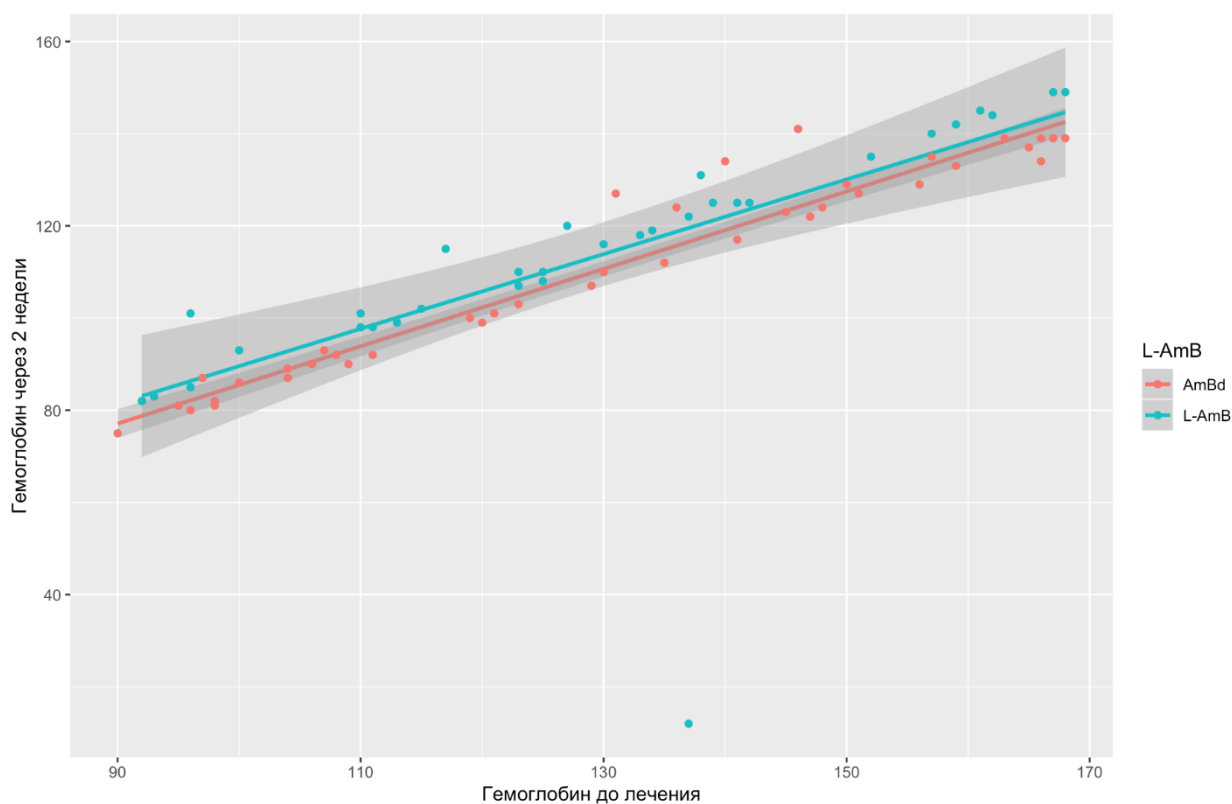


Рисунок 17. Зависимость конечного уровня гемоглобина от исходного через 2 недели терапии в двух группах

В течение 2 недели терапии снижение средних значений концентраций гемоглобина в группе AmBd происходило на 6,9%, в группе L-AMB – на 8,1%.

Таким образом, сравнение динамики прироста креатинина среди пациентов, получавших амфотерицина В дезоксихолат и липосомальный амфотерицин В, позволяет говорить о достоверных различиях в исследуемых группах. Концентрация креатинина нарастала более интенсивно у больных, получавших конвенциональную форму препарата: за первую неделю разница составила 21,3%, за вторую – 9,5%.

В ходе изучения динамики убыли концентрации гемоглобина в тех же группах достоверные различия выявлялись лишь в исходе первой недели. В течение

второй половины индукционной фазы снижение показателя в группе L-AMB оказалось даже более существенным, чем среди лиц, в лечении которых применялся AmBd. Через 7 дней после старта терапии разница составляла 4% с преобладанием дезоксихолата, через 14 дней – 1,2%, при этом больше был удельный вес больных, получавших липосомальную форму. Устранение статистически значимых различий в концентрации гемоглобина может быть связано с нарастанием ишемизации почечной паренхимы, начиная со второй недели лечения. Продолжительная гипоксия является фактором, стимулирующим экскрецию новых порций эритропоэтина перитубулярными клетками, что, свою очередь, сглаживает различия между побочными эффектами обсуждаемых препаратов. [75-77]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Криптококкоз является оппортунистическим висцеральным микозом, преимущественно поражающим легочную паренхиму, ткани головного мозга и мозговые оболочки. К группам риска развития данного заболевания относят больных с первичными и вторичными иммунодефицитами, среди которых наибольший удельный вес имеют пациенты с ВИЧ-инфекцией. Начальная фаза этиотропной терапии обсуждаемой патологии отличается высокой токсичностью, связанной в основном с поражением ткани почек и анемизацией.

Обнаружение высокой частоты сочетанного течения криптококковой инфекции и туберкулеза представляет большой интерес с точки зрения клинической фармакологии: совместное назначения амфотерицина В и противотуберкулезных средств, некоторые из которых также нефротоксичны, требует тщательного анализа используемых сочетаний препаратов. В лечении таких больных применение L-AMB представляется более обоснованным, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Статистически достоверных данных, свидетельствующих о большей эффективности L-AMB в отношении регресса неврологической симптоматики и санации ликвора не выявлено. Однако прослеживается тенденция по превосходству липосомальной формы при сравнении показателей выживаемости в двух группах. Есть основания полагать, что в случае большего числа исследуемых лиц различия могут оказаться существеннее. Для отдельных пациентов должна обсуждаться возможность назначения двойной терапевтической дозы L-AMB off label, опережающей регламентированные дозы обеих форм амфотерицина В по всем обсуждаемым параметрам.

Обнаружение статистически достоверных различий в степени выраженности побочных эффектов исследуемых препаратов позволяет выделить больных, для которых назначение липосомальной формы оказывается предпочтительным: это лица с хроническими заболеваниями почек, течение

которых сопровождается снижением клиренса креатинина и СКФ. С целью профилактики анемизирующего действия антимикотика может быть рассмотрено заблаговременное назначение препаратов железа или эритропоэтина.

ВЫВОДЫ

1. Среди исследуемых больных с верифицированным диагнозом церебрального криптококкоза выявлялись пациенты 4В и 5 стадий ВИЧ-инфекции по классификации В. И. Покровского (84% и 16% соответственно) и С3 по CDC, имевшие ухудшение состояния без АРВТ. В структуре коморбидных оппортунистических инфекций отмечалось преобладание орофарингеального кандидоза (82,7%) и туберкулеза (28%). Полученные данные явились закономерным следствием обнаруженного угнетения клеточного звена иммунитета и высокой вирусной нагрузки.
2. Около трети всех пациентов (n=25) с положительными результатами культуральных и серологических исследований, подтверждающих факт обсеменения мозговых оболочек, не обнаруживали достоверных клинических эквивалентов этого состояния. Кроме того, выявлялось преобладание частоты неспецифической общемозговой симптоматики над менингеальной. Результаты ликворологического исследования позволяют сделать вывод о промежуточном положении характеристик криптококкового менингита, которые имеют определенное сходство как с признаками гнойных форм (гиперпротеинария, гипогликорахия), так и с серозными вариантами поражения мозговых оболочек (лимфоцитарный плеоцитоз).
3. Количество больных в сравниваемых группах, достигших обозначенных конечных точек в заданные моменты времени, не позволяет говорить о наличии статистически достоверных различий в динамике разрешения неврологической симптоматики, скорости санации ликвора и выживаемости при использовании различных схем индукционной терапии, включающей амфотерицин В дезоксихолат или липосомальный амфотерицин В. Единственной непосредственной причиной смерти в исследуемых группах явился острый отек-набухание головного мозга, ставший исходом нарастающей гидроцефалии.

4. Сравнение динамики прироста креатинина среди пациентов, получавших AmBd и L-AMB, позволяет говорить о достоверных различиях в исследуемых группах. Концентрация креатинина нарастала более интенсивно у больных, получавших конвенциональную форму препарата: за первую неделю разница составила 21,3%, за вторую – 9,5%. Изучение динамики убыли концентрации гемоглобина в тех же группах демонстрирует достоверные различия лишь в исходе первой недели: спустя 7 дней после старта терапии разница составляла 4% с преобладанием дезоксихолата, через 14 дней – 1,2% при большем удельном весе больных, получавших липосомальную форму. Приводимые данные свидетельствуют о достоверно меньшей нефротоксичности L-AMB и его меньшем анемизирующем действии в течение первой недели терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Voelz K., May R.C. Cryptococcal interactions with the host immune system // *Eukaryotic cell*. – 2010. – Vol.9, №6 – P. 835-846.
2. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 15245–50.
3. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. pp. 2934–48.
4. Hajjman A, Conn LA, Stephens DS. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis*. 1999; 179:449–454.
5. McCarthy KM, Morgan J, Wannemuehler KA, et al. Population-based surveillance for cryptococcosis in an antiretroviral-naïve South African province with a high HIV seroprevalence. *AIDS*. 2006; 20:2199–2206.
6. Hakim JG, Gangaidzo IT, Heyderman RS. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *AIDS*. 2000; 14:1401–1407.
7. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017.
8. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: Дисс...докт. биол. наук. – СПб., 2005.
9. Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*. 2010;27: 875–904.
10. *Cryptococcus* [Electronic resource]. URL: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/yeasts/cryptococcus/> (accessed: 29.01.2020).

11. Saijo T, Chen J, Chen S, et al. Anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. *MBio*. 2014;5(2): e00912–4.
12. Chen S, Meyer W, Sorrell T. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):980–1024.
13. Gerstein AC, et al. Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. *mBio*. 2015;6: e01340–e01415.
14. Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclère A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *mBio*. 2015;6: e02580–e02614.
15. Zaragoza O. Multiple disguises for the same party: the concepts of morphogenesis and phenotypic variations in *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbio*. 2011; 2:181.
16. Coelho C, Bocca A, Casadevall A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2014;87: 1–41.
17. Liliane Mukaremera, Keunsook K. Lee, Jeanette Wagener, Darin L. Wiesner, Neil A.R. Gow, Kirsten Nielsen. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *The Cell Surface*. Volume 1. 2018. Pages 15-24.
18. Heiss C, Skowrya ML, Liu H, Klutts JS, Wang Z, Williams M, Srikanta D, Beverley SM, Azadi P, Doering TL. Unusual Galactofuranose Modification of a Capsule Polysaccharide in the Pathogenic Yeast *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288: 994–1003.
19. Liliane Mukaremera, Keunsook K. Lee, Jeanette Wagener, Darin L. Wiesner, Neil A.R. Gow, Kirsten Nielsen, Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection, *The Cell Surface*, Volume 1, 2018, Pages 15-24.
20. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50: 3519–28.

21. Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H., & Doering, T. L. (2014). *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast* (Chichester, England), 31(2), 47–60.
22. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50: 3519–28.
23. Brown SM, Campbell LT, Lodge JK. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current Opinion in Microbiology*. 2007;10: 320–5.
24. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gatti*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015;78: 16–48.
25. Cogliati M, D'Amicis R, Zani A, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(4)
26. Chen Y, Litvintseva A, Frazzitta A, et al. Comparative analyses of clinical and environmental populations of *Cryptococcus neoformans* in Botswana. *Mol Ecol*. 2015;24(14):3559–71.
27. Ruiz A, Neilson J, Bulmer G. Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. *Sabouraudia*. 1982;20(1): 21–9.
28. Bratton E, El Husseini N, Chastain C, et al. Comparison and temporal trends of three groups with Cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PLoS One*. 2012;7(8): e43582.
29. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009;23: 525–30.
30. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. pp. 2934–48.
31. Okagaki LH, Nielsen K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryot. Cell*. 2012;11: 820–826.

32. Smith LM, Dixon EF, May RC. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cell. Microbiol.* 2014
33. Davis MJ, et al. *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J. Immunol.* 2015;194: 2219–2231.
34. Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski Lda S, Casadevall A. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. *mBio.* 2011;2: e00167–e00111.
35. Evans RJ, et al. Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. *Infect. Immun.* 2015;83: 1296–1304.
36. Erb-Downward JR, Noggle RM, Williamson PR, Huffnagle GB. The role of laccase in prostaglandin production by *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 2008;68: 1428–1437.
37. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(2):106–117. doi:10.1038/nrmicro.2015.6
38. Vu K, et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *mBio.* 2014;5: e01101–e01114.
39. Liu TB, et al. Brain inositol is a novel stimulator for promoting *Cryptococcus* penetration of the blood-brain barrier. *PLoS Pathog.* 2013;9: e1003247.
40. Charlier C, et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 2009;77: 120–127.
41. Kechichian TB, Shea J, Del Poeta M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 2007;75: 4792–4798.
42. Chen Y, et al. The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. *mBio.* 2014;5: e01087–e01013.

43. Robertson EJ, et al. *Cryptococcus neoformans* ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 2014;209: 74–82.
44. Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infectious disease clinics of North America*, 30(1), 179–206.
45. Brizendine K, Baddley J, Pappas P. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(6): 727–34.
46. Visnegarwala F, Graviss EA, Lacke CE, Dural AT, Johnson PC, Atmar RL, Hamill RJ. Acute respiratory failure associated with cryptococcosis in patients with AIDS: analysis of predictive factors. *Clin Infect Dis.* 1998;27: 1231–7.
47. Clark RA, Greer DL, Valainis GT, Hyslop NE. *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1990;3: 480–4.
48. Ghatalia PA, Vick A, Vattoth S, Roberson GH, Pappas PG, et al. Reversible blindness in cryptococcal meningitis with normal intracranial pressure: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2014; 59: 310–3.
49. da Cunha Colombo ER, Mora DJ, Silva-Vergara ML. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) associated with *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS patients. *Mycoses.* 2011;54(4): e178–82.
50. Franco-Paredes C, Womack T, Bohlmeier T, et al. Management of *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15: 348–55.
51. Antinori S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS.* 2013;2013: 471363.
52. Sato Y, Osabe S, Kuno H, et al. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci.* 1999;164: 72–5.
53. Malabonga VM, Basti J, Kamholz SL. Utility of bronchoscopic sampling techniques for cryptococcal disease in AIDS. *Chest.* 1991;99: 370–2.
54. Marcio L. Rodrigues, Mauricio Alvarez, Fernanda L. Fonseca, Arturo Casadevall, Binding of the Wheat Germ Lectin to *Cryptococcus neoformans*

- Suggests an Association of Chitinlike Structures with Yeast Budding and Capsular Glucuronoxylomannan, *Eukaryotic Cell* Apr 2008, 7 (4) 602-609.
55. Tanner DC, Weinstein MP, Fedorciw B, et al. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol.* 1994;32: 1680–4.
 56. Huang H, Fan L, Rajbanshi B, et al. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: a meta-analysis and systematic review. *PLoS One.* 2015;10(5): e0127117.
 57. Williams D, Kiiza T, Kwizera R, et al. Evaluation of fingerstick cryptococcal antigen lateral flow assay in HIV-infected persons: a diagnostic accuracy study. *Clin Infect Dis.* 2015;61(3): 464–7.
 58. Kabanda T, Siedner M, Klausner J, et al. Point-of-care diagnosis and prognostication of cryptococcal meningitis with the cryptococcal lateral flow assay on cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 2014;58(1): 113–6.
 59. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PLoS ONE.* 2013;8: e60431.
 60. Anderson TM, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* 2014;10: 400–406.
 61. Brouwer AE, et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet.* 2004;363: 1764–1767.
 62. Day JN, et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 2013;368: 1291–1302.
 63. Hamill RJ, Sobel JD, El-Sadr W, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2): 225–32.
 64. van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1997;337: 15–21.

65. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O, et al. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The Crypto A/D Study. *PLoS Med.* 2007;4: e21.
66. Dromer F, Bernede-Bauduin C, Guillemot D, et al. Major role for amphotericin-flucytosine combination in severe cryptococcosis. *PLoS One.* 2008;3(8): e2870.
67. Day JN, Chau T, Wolbers M, et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2013;368: 1291–302.
68. Pappas PG, Chetchotisakd P, Larsen RA, et al. A phase II randomized trial of amphotericin B alone or combined with fluconazole in the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2009;48: 1775–83.
69. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical Practice Guide lines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 update by the Infectious Disease Society of America. *Clin Infect Dis.* 2010;50: 291–322.
70. Bozette SA, Larsen RA, Chiu J, et al. A placebo-controlled trial of maintenance therapy with fluconazole after treatment for cryptococcal meningitis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med.* 1991;324: 580–4.
71. Mussini C, Pezzotti P, Miro JM, et al. Discontinuation of maintenance therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS treated with HAART: an international observational study. *Clin Infect Dis.* 2004;38: 565–71.
72. Loyse A, Wilson D, Meintjes G, et al. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2012;54: 121–8.
73. Bisson G, Molefi M, Bellamy S, et al. Early versus delayed antiretroviral therapy and cerebrospinal fluid fungal clearance in adults with HIV and cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2013;56(8): 1165–73.
74. Boulware D, Meya D, Muzoora C, et al. Timing of antiretroviral therapy after cryptococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2014;370: 2487–98.

75. Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, et al. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. *Clin Infect Dis*. 2003;37: 415–425.
76. Cleary JD, Rogers PD, Chapman SW. Variability in polyene content and cellular toxicity among deoxycholate amphotericin B formulations. *Pharmacotherapy*. 2003;23: 572–578.
77. Rocha PN, Kobayashi CD, de Carvalho Almeida L, et al. Incidence, predictors, and impact on hospital mortality of amphotericin B nephrotoxicity defined using newer acute kidney injury diagnostic criteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59: 4759–4769.
78. Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013;73: 919–934.
79. Stone NRH, Bicanic T, Salim R, et al. Liposomal amphotericin B (Ambisome): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs*. 2016;76: 485–500.
80. Johnson PC, Wheat LJ, Cloud GA, et al. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin B for induction therapy of histoplasmosis in patients with AIDS. *Ann Intern Med*. 2002;137: 105–109.
81. Prentice HG, Hann IM, Herbrecht R, et al. A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *Br J Haematol*. 1997;98: 711–718.
82. McClelland EE, Hobbs LM, Rivera J, et al. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. *PLoS ONE*. 2013;8: e63632.
83. Is HIV-associated tuberculosis a risk factor for the development of cryptococcal disease? Jarvis JN, Harrison TS, Corbett EL, Wood R, Lawn SD *AIDS*. 2010 Feb 20; 24(4):612-4.
84. Fang W, Zhang L, Liu J, et al. Tuberculosis/cryptococcosis co-infection in China between 1965 and 2016. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6(8): e73. Published 2017 Aug 23. doi:10.1038/emi.2017.61
85. Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 1989; 3:77–102.
86. Діагностическое значение лабораторных показателей: практ. пособие/ Е. Т. Зубовская [и др.]; М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ.

науч.-практ. центр «Мать и дитя», Респ. мед. акад. последиплом. образования. Минск: БГУФК, 2013. 422 с.

87. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации, Национальная ассоциация специалистов по профилактике, диагностике и лечению ВИЧ-инфекции «ВИЧ-инфекция у взрослых», 2019 г.
88. Stages of HIV Infection [Electronic resource]. URL: https://wwwn.cdc.gov/hivrisk/what_is/stages_hiv_infection.html (accessed: 27.03.2020).
89. Leenders AC, Reiss P, Portegies P, et al. Liposomal amphotericin B (Ambisome) compared with amphotericin B followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*. 1997;11: 1463–1471.
90. Hamil RJ, Sobel JD, El-Sadr W, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and amphotericin B for the treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *Clin Infect Dis*. 2010;51: 225–232.